

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/02587 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/56,  
9/24, C07K 16/40, C12N 1/16, C12Q 1/68, G01N 33/68,  
33/573, A61K 31/70, 38/45, 39/395, A01H 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04972

(22) Internationales Anmeldedatum:  
31. Mai 2000 (31.05.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 30 959.0 5. Juli 1999 (05.07.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES  
GMBH & CO KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REHFELDT, Klaus

[DE/DE]; Mühlenstrasse 8, D-66111 Saarbrücken  
(DE). THEISEN, Simone [DE/DE]; Weidenstrasse  
31-32, D-66113 Saarbrücken (DE). WEILER, Frank  
[DE/DE]; Breslauerstrasse 43, D-66121 Saarbrücken  
(DE). SCHMITT, Manfred [DE/DE]; In den Kastler  
Rödern 14, D-66386 St. Ingbert (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BR, BY, CA, CN,  
CZ, HU, IL, IN, JP, KR, NO, NZ, PL, RO, SG, SK, TR,  
UA, US, YU, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

**Veröffentlicht:**

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NOVEL ANTIFUNGAL AGENTS AND FUNGICIDES, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND  
THEIR USE

(54) Bezeichnung: NEUE ANTIMYCOTIKA UND FUNGIZIDE, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND IHRE VER-  
WENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to the preparation of protein toxins from yeasts so-called killer yeasts using genetic technology  
in order to control human pathogenic and plant pathogenic yeasts and/or fungi, whereby these are selectively destroyed. The high  
specificity enables the protein toxins to be used as an antifungal agent and/or fungicide. In addition, protein toxins of this type can  
be used for protecting plants.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die gentechnische Bereitstellung von Proteintoxinen aus Hefen - sogenannte Kil-  
lerhefen - zur Bekämpfung von human- und pflanzenpathogenen Hefen und/oder Pilzen, wobei diese selektiv abgetötet werden. Die  
hohe Spezifizität gewährleistet den Einsatz der Proteintoxine als Antimycoticum und/oder Fungizid. Zudem können derartige Pro-  
teintoxine zum Pflanzenschutz verwendet werden.



WO 01/02587 A2



Neue Antimycotika und Fungizide, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Antimycotika und Fungizide erhältlich aus Hefe, Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung.

10

Selektive Antimycotika haben größte Bedeutung, da Pilz- und/oder Hefe-bedingte Infektionen beim Menschen in den letzten Jahren stark zugenommen haben und ebenfalls in Lebens- und Futtermittel immer wieder zu unerwünschten Kontamination führen. Besonders schwerwiegende Folgen haben Mycosen bei immunsupprimierten Patienten, deren zelluläres und humorales Abwehrsystem auf einem nicht voll funktionstüchtigen Niveau gehalten werden muß [Anaissie, 1992; Meunier *et al.*, 1992; Wingard, 1995]. Extrem Mycose-gefährdet sind *HIV-1*-infizierte Personen (AIDS), die im fortgeschrittenen Krankheitsstadium sehr häufig an opportunistischen Infektionen durch Human-pathogene Pilze und/oder Hefen sterben [Levy, 1993]. Die gegenwärtig zur Therapie solcher Infektionen eingesetzten Antimycotika (wie Amphotericin B, Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol) besitzen beträchtliche Nebenwirkungen, da sie die strukturelle Integrität der eukaryotischen Cytoplasmamembran zerstören und dadurch ebenfalls den infizierten Wirtsorganismus schädigen [Hector, 1993]. Die Applikation herkömmlicher Antimycotika hat zudem in nur kurzer Zeit zu einer rapiden Zunahme an Fluconazol-Resistenzen geführt, die sich unter den humanpathogenen Mikroorganismen rasch ausbreiten und ein immer größer werdendes Problem darstellen [Cameron *et al.*, 1993; Chavenet *et al.*, 1994; Maenza *et al.*, 1996; Pfaller *et al.*, 1994; Rex *et al.*, 1995; Troillet *et al.*, 1993]. Es ist daher ein wichtiges Anliegen, Antimycotika zu entwickeln, die sich - ähnlich wie bakterielle Antibiotika - durch hohe Selektivität auszeichnen und möglichst nur humanpathogene Pilze und Hefen angreifen. Da jedoch die Mehrheit aller zellulären Prozesse bei höheren Organismen von Genprodukten gesteuert wird, die bei Eukaryoten ein hohes Maß an funktioneller Homologie zeigen, ist es bislang nicht gelungen, "spezifisch-antifungale Antibiotika" zu entwickeln [Kurz, 1998; Komiyama *et al.*, 1998].

25

20

30

Ein *target* von selektiven Antimycotika sind die  $\beta$ -1,3-D-Glukane der Hefezellwand, die für die mechanische und osmotische Stabilität der Zelle unerlässlich sind, jedoch in höheren Eukaryoten nicht vorkommen und daher als "Achillesverse" bei der Bekämpfung pathogener Hefen genutzt werden könnten [Roemer *et al.*, 1994]. Obwohl

5 Substanzen, die selektiv in die Zellwandstruktur von Hefen und Pilzen eingreifen, somit von großem Interesse sind, wurden bislang noch keine Antibiotika-ähnlichen Hemmstoffe zur Behandlung von Mycosen eingesetzt. Während bakterielle Antibiotika-Produzenten bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts entdeckt wurden, konnten ähnliche Effekte bei Hefen erst Anfang der Sechziger Jahre mit der Identifizierung

10 sogenannter 'Killer'-Hefen beobachtet werden [Bevan & Makower, 1963]: Toxinproduzierende 'Killer'-Stämme der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* produzieren und sezernieren sogenannte als "Killertoxine" bezeichneten Proteine, welche sensitive Hefen in einem Rezeptor-abhängigen Prozeß abtöten [Bussey, 1991; Tipper & Schmitt, 1991]. Die Fähigkeit zur Toxinproduktion beruht bei *S. cerevisiae* auf einer

15 Infektion mit Reovirus-ähnlichen Doppelstrang-RNA-Viren, die im Cytoplasma der Hefe stabil und in hoher Kopienzahl persistieren, ohne die eukaryotische Wirtszelle in erkennbarer Weise zu schädigen [Tipper & Schmitt, 1991]. Bei den drei bislang bekannten Killertoxinen (K1, K2, K28) der Hefe *S. cerevisiae* handelt es sich um nicht-glykosylierte  $\alpha/\beta$ -Heterodimere, die von der infizierten Zelle als höhermolekulare Präprotoxine translatiert und auf dem intrazellulären Sekretionsweg durch komplexe Modifikationen zu den biologisch aktiven Killerproteinen prozessiert werden

20 [Hanes *et al.*, 1986; Dignard *et al.*, 1991; Schmitt & Tipper, 1995]. Die toxische Wirkung der *S. cerevisiae* Toxine beruht entweder auf einer Zerstörung der Membraintegrität (Toxine K1, K2) oder (wie im Falle von Killertoxin K28) auf einem Zellzyklus-Arrest mit gezielter Hemmung der DNA-Synthese [Bussey, 1991; Schmitt & Compain, 1995; Schmitt *et al.*, 1996]. Obwohl sich Killertoxine der Klassen K1, K2 und K28 in ihren Wirkungsweisen und physikochemischen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden, ist ihnen gemeinsam, daß sie enge Wirkungsspektren besitzen und überwiegend sensitive Hefen nahe verwandter Arten abtöten. Dieses

25 eingeschränkte Wirkspektrum beruht darauf, daß die bislang charakterisierten Killertoxine der Bäckerhefe mit unterschiedlichen Rezeptor-Populationen auf den Ebenen von Hefezellwand und Cytoplasmamembran interagieren müssen, um eine sensitive Zielzelle abtöten zu können. Bei den primären Toxinrezeptoren der Hefe-

30

zellwand handelt es sich entweder um stark verzweigte  $\beta$ -1,6-D-Glukane oder um die äußeren Mannotriose-Seitenketten eines Zellwand-Mannoproteins [Bussey, 1991; Schmitt & Radler 1987, 1988].

5 Neben den viralen Proteintoxinen der Hefen *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* und *Ustilago maydis*, wurden Killerstämme auch in den Gattungen *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis* und *Williopsis* beschrieben [McCracken *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996; Schmitt & Neuhausen, 1994; Walker *et al.*, 1995]. Die gene-  
10 tische Grundlage des Killerphänomens beruht in diesen Hefen jedoch nicht auf viralen Genomen, sondern entweder auf linearen dsDNA-Plasmiden oder auf chromosomalen Hefegenen [Schründer *et al.*, 1994].

Intensive molekularbiologische Untersuchungen verschiedener Toxin-produzierender  
15 "Killerhefen" haben gezeigt, daß die Sekretion toxischer Proteine ('Killertoxine') bei Hefen weitverbreitet ist und ein nicht zu unterschätzendes Potential bei der Entwicklung selektiver Antimycotika darstellt [Walker *et al.*, 1995; Hodgson *et al.*, 1995; Polonelli *et al.*, 1986; Schmitt & Neuhausen, 1994; Neuhausen & Schmitt, 1996; Schmitt *et al.*, 1997], jedoch konnten solche Proteintoxine bisher nicht bereitgestellt  
20 werden.

Daher ist es Aufgabe dieser Erfindung geeignete hochwirksame Proteintoxine mit antimycotischer oder fungizider Wirkung zur Bekämpfung von human und pflanzen-  
25 pathogenen Hefen und/oder Pilzen bereitzustellen.

In überraschender Weise erweisen sich nunmehr das hochwirksam produzierte und sezernierte Killertoxin WICALTIN (auch Proteintoxin) aus der Wildtyphefe *Williopsis californica* Stamm 3/57 (DSM 12865) und das viruskodierte ZYGOCIN (auch Proteintoxin) der Hefe *Zygosaccharomyces bailii* (DSM 12864) als besonders geeignet  
30 zur Bekämpfung von human- und pflanzenpathogenen Hefen und/oder Pilzen. Zudem können im Lebens- und Futtermittelbereich gefürchtete Schadhefen und Pilze abgetötet werden. Beide Proteintoxine besitzen daher das Potential als

Antimycotikum und/oder Fungizid zur Bekämpfung von Hefe und/oder Pilzinfektionen, insbesondere Mycosen, eingesetzt zu werden. Diese Indikationen werden in der vorliegenden Erfindung durch Untersuchungen zur Wirkungsweise verifiziert. Die Toxingene werden im Rahmen dieser Erfindung geeignet kloniert und sequenziert und somit wird ein Verfahren für die gentechnische Herstellung und Überexpression in Kultur von WICALTIN und ZYGOCIN etabliert.

Ein Gegenstand der Erfindung betrifft daher Proteintoxine erhältlich aus *Williopsis californica*, besonders bevorzugt der Stamm DSM 12865 und *Zygosaccharomyces bailii*, besonders bevorzugt der Stamm DSM 12864. Beide Stämme wurden am 09. Juni 1999 am DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, in 38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b nach dem Budapester Vertrag hinterlegt ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)).

Im Rahmen dieser Erfindung sezernieren insbesondere DSM 12864 und DSM 12865 biologisch hochwirksame Proteintoxine, die aufgrund ihres breiten Wirkspektrums (siehe Beispiel 4 und 7) auch zahlreiche human- und pflanzenpathogene Hefen und Pilze abtöten. Daher betrifft die Erfindung auch selektive Antimycotika oder Fungizide, in dem Sinne, daß es sich bei den Proteintoxinen - und den nachstehenden erfindungsgemäßen Polypeptiden und deren kodierenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, insbesondere in der funktionellen Einheit eines Toxingens - um potentielle *Bio-Pharmaka* handelt, die aufgrund ihrer spezifischen, rezeptorvermittelten Wirkung ausschließlich Hefen und / oder Pilze abtöten und für höhere Eukaryoten - und damit ebenfalls für den Menschen und Säugetierzellen – sowie Pflanzen, vorzugsweise Kulturpflanzen, völlig ungefährlich sind [Vgl. Pfeiffer *et al.*, 1988].

Folgende human- und pflanzenpathogene sowie apathogene Hefen und / oder Pilze können selektiv abgetötet werden:

Zygotin-sensitive Hefearten: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida vini*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Methschnikowia pulcherrima*, *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *Pichia jadinii*, *Pichia membranefaciens*, *Yarrowia lipolytica* und *Zygosaccharomyces rouxii*.

Wicaltin-sensitive Hefearten: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia anomala*, *Pichia jadinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporthrix spec.*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulaspora pretoriensis*, *Yarrowia lipolytica* und *Zygosaccharomyces bailii*.

Die besonders starke Aktivität des Wicaltin-produzierenden Hefestammes DSM 12865 beruht vermutlich auf dessen ausgeprägter Sekretionseffizienz, die im Vergleich zu anderen Stämmen der gleichen Hefeart deutlich stärker ausgeprägt ist. Die 'Killer'-Eigenschaft des Zygotin-produzierenden Hefestammes DSM 12864 beruht auf einer Infektion mit toxinkodierenden Doppelstrang-RNA-Viren (M<sub>Zb</sub>-dsRNA), die stabil und in hoher Kopienzahl im Cytoplasma persistieren und die betreffende Hefe (Stamm DSM 12864) zur Produktion und Sekretion von Zygotin befähigen [Vgl. Schmitt & Neuhausen, 1994]. Andere Stämme der gleichen Art zeigten keine Toxinproduktion, da sie keine toxinkodierenden dsRNA-Viren im Cytoplasma beherbergen und somit phänotypisch als 'Nicht-Killer' zu klassifizieren sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Nukleinsäuren kodierend für ein Proteintoxin - mit einer Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID No 1** und **No 2** und einer Glucanase-Aktivität - oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 300 Nukleotiden (nachfolgend "erfindungsgemäße Nukleinsäure(n)" genannt).

Die vollständigen Nukleinsäuren kodieren für Proteintoxine, die nach intrazellulärer Prozessierung und Sekretion eine Größe von 309 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 34 kDa (**SEQ ID No 1**) bzw. von 99 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 10 kDa aufweisen (**SEQ ID No 2**). Die Expression der Nukleinsäure nach **SEQ ID No 1** in der Hefe *S. cerevisiae* resultiert in einem rekombinanten WICALTIN, das als glykosyliertes Protein mit signifikanter  $\beta$ -1,3-D-Glucanase-Aktivität in den Kulturüberstand der Hefe sezerniert wird [Vgl. Beispiel 10]. Weitere Experimente gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigten, daß es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um Nukleinsäuren handelt, die im Falle von **SEQ ID No 1** für

ein Proteintoxin mit Glucanase – Aktivität und im Falle von **SEQ ID No 2** für ein *in vivo* vermutlich O-glykosyliertes, als ZYGOCIN bezeichnetes Proteintoxin kodieren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind erhältlich aus DSM 12865 (**SEQ ID No 1**) und DSM 12864 (**SEQ ID No 2**).

5

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß **SEQ ID No 1** von Pos. 1 bis Pos. 947 und gemäß **SEQ ID No 2** von Pos. 1 bis Pos. 713 . Die beiden Positionen be-

10 bestimmen gemäß der vorliegenden Erfindung den Start und das Ende des kodierenden Bereiches, d.h. die jeweils erste und letzte Aminosäure des betreffenden Leserasters.

10

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" versteht man gemäß der vorliegenden Er-

15 findung eine Nukleinsäure, die funktionell mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren verwandt sind. Beispiele verwandter Nukleinsäuren sind Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Hefezellen bzw. Stämmen und Kulturen oder allelische Varianten. Ebenfalls umfaßt die vorliegende Erfindung Varianten von Nukleinsäuren, die von verschiedenen Hefen / Hefestämmen oder anderen Infektionserregern wie Dermato-

20 phyten und Schimmelpilzen (gemäß dem DHS-System) stammen können.

15

20

Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff "Varianten" gemäß der vorliegen-

den Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenziden-

25 tität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.

25

Die Teile der erfindungsgemäßen Nukleinsäure können beispielsweise zur Herstel-

lung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varian-

ten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich

eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure,

30 eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim PCR-

Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden für die Identifizie-

rung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden

als Sonde.

30



In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz, eine oder mehrere (für die intrazelluläre Pro-Protein-Prozessierung notwendige) Kex2p Endopeptidase Erkennungssequenzen sowie eine oder mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des kodierenden Toxingens, enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise im Falle der Nukleinsäure nach **SEQ ID No 2** prokaryotische und/oder eukaryotische Expressionsvektoren bzw. im Falle der Nukleinsäure nach **SEQ ID No 1** ausschließlich eukaryotische Expressionsvektoren sein. Die Expression der toxinkodierenden Nukleinsäure nach **SEQ ID No 1** in *Escherichia coli* ist nicht möglich, da das betreffende, heterolog exprimierte Proteintoxin für die Bakterienzelle toxisch ist. Eine Klonierung der WICALTIN-kodierenden Nukleinsäure nach **SEQ ID No 1** ist in *E. coli* nur mit Plasmiden möglich, die keinen Promotor tragen (z.B. mit Hilfe von Derivaten des Plasmids pBR322). Ein Beispiel für einen prokaryotischen Vektor, der eine heterologe Expression der ZYGOCIN-kodierenden Nukleinsäure nach **SEQ ID No 2** erlaubt, ist der kommerziell erhältliche Vektor pGEX-4T-1, der in *E. coli* die Expression eines Gluthathion-S-Transferase-ZYGOCIN-Fusionsproteins erlaubt. Ein weiterer Vektor für die Expression von ZYGOCIN in *E. coli* ist z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reinigung des exprimierten Proteins über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (s. z.B. EP-B1-0154133), den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) *Nature*, 214, 228).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren, oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z.B. ein Adenoassoziiierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei insertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

Geeignete Adenovirusvektoren sind beispielsweise in McGrory, W.J. et al. (1988) *Virol.* 163, 614; Gluzman, Y. et al. (1982) in "Eukaryotic Viral Vectors" (Gluzman, Y. ed.) 187, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Chroboczek, J. et al. (1992) *Virol.* 186, 280; Karlsson, S. et al. (1986) *EMBO J.* 5, 2377 oder WO95/00655 beschrieben.

Geeignete Adeno-assoziierte Virusvektoren sind beispielsweise in Muzyczka, N. (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158, 97; WO95/23867; Samulski, R.J. (1989) *J. Virol.* 63, 3822; WO95/23867; Chiorini, J.A. et al. (1995) *Human Gene Therapy* 6, 1531 oder Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5, 793 beschrieben.

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert. Hierzu eignen sich Lipidmischungen wie bei Felgner, P.L. et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413; Behr, J.P. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6982; Felgner, J.H. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2550 oder Gao, X. & Huang, L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 195 beschrieben. Bei der Herstellung der Liposomen wird die DNA ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die DNA vollständig von den Liposomen komplexiert wird.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor zur Herstellung von transgenen Pflanzen, enthalten. Da die beschriebenen Killertoxine WICALTIN und ZYGOCIN ein breites Wirkungsspektrum besitzen und auch pflanzenpathogene He-

5 fen und Pilze abtöten, ist es möglich transgene Pflanzen bereitzustellen, die sich beispielsweise gegenüber einer Infektion mit dem Mais-pathogenen Erreger *Ustilago maydis* resistent verhalten. Ähnliche Versuche wurden bereits an Tabak-Pflanzen durchgeführt, die durch heterologe Expression des natürlicherweise viral kodierten Killertoxins KP4 von *U. maydis* in der Lage waren, das betreffende Proteintoxin zu

10 sezernieren und dadurch einen spezifischen Schutz gegen Infektionen mit bestimmten phytopathogenen Stämmen von *U. maydis* aufbauten (Park et al., 1996; Kinal et al., 1995; Bevan, 1984). Aufbauend auf kommerziell erhältlichen Transformationssystemen, die auf modifizierten Derivaten des natürlichen Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* beruhen, können die erfindungsgemäßen Nukleinsäu-

15 ren, ebenfalls repräsentiert in den Toxingenen *WCT* und *ZBT*, in sogenannte bidirektionale pBI-Vektoren (Fa. CLONTECH) einkloniert und zur Herstellung transgener Pflanzen eingesetzt werden. Die betreffenden Toxingene *WCT* und *ZBT* werden hierzu unter Transkriptionskontrolle des starken Blumenkohl-Mosaikvirus-Promotors (CaMV-P) gebracht. Der genauere Aufbau der zu konstruierenden Vektoren ist im

20 Beispiel 9 schematisch dargestellt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise chemisch anhand der **SEQ ID No 1 und No 2** offenbaren Sequenzen oder anhand der in **SEQ ID No 1 und No 2** offenbaren Peptidsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes

25 z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No. 4). Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäße Nukleinsäure in die Hand zu bekommen, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring

30 Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren Sequenz aus der Nukleinsäuresequenz gemäß **SEQ ID No 1 und No 2** abgeleitet werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die Polypeptide als solche mit einer Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID No 1 und No 2** oder einer funktionellen Variante davon, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 12 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit 309 Aminosäuren (**SEQ ID No 1**) und mit 99 Aminosäuren (**SEQ ID No 2**) (nachfolgend "erfindungsgemäße Polypeptid(e)" genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren-langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper dient (siehe hierzu z. B. US 5,656,435).

Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörper dienen.

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Peptid verwandt sind, d.h. eine Glucanase-Aktivität aufweisen. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten oder Polypeptide, die von verschiedenen Hefen / Hefestämmen oder anderen Infektionserregern wie Dermatophyten, Schimmelpilzen (gemäß dem DHS-System) stammen können.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß Figur 2 haben. Ferner zählen hierzu auch Deletion des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60, vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer Glucanase haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-humanen Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-humanen Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von E. coli oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B.

ein Met-Ala-His<sub>6</sub>-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionenhaltige Säulen, beispielsweise über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule. "NTA" steht für den Chelator "nitrilotriacetic acid" (Qiagen GmbH, Hilden). Insofern umfaßt die Erfindung auch solche erfindungsgemäße Polypeptide die maskiert sind, im Sinne eines Proteins oder im weitesten Sinne als *Pre-drug*.

Die Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide werden beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt. Als Wirtszellen zur Herstellung korrekt prozessierter und damit biologisch aktiver Proteintoxine eignen sich ausschließlich eukaryotische Organismen, vorzugsweise die Sproßhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*.

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antiseren, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

Ganz besonders bevorzugt ist die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, da sich diese Hefe natürlicherweise WICALTIN- und ZYGOCIN-resistent verhält und bereits mehrfach erfolgreich zur heterologen Expression von Fremdproteinen eingesetzt wurde [Giga-Hama & Kumagai (1997), in "Foreign Gene Expression in Fission Yeast: *Schizosaccharomyces pombe*", Springer Verlag]. Wie in Beispiel 11 ausge-

führt, können die toxinkodierenden Nukleinsäuren nach **SEQ ID No 1** und **SEQ ID No 2** beispielsweise in den *S. pombe* Vektor pREP1 einkloniert werden [Maundrell (1990), J. Biol. Chem. 265:10857-10864], in dem sie unter Transkriptions-Kontrolle des Thiamin-regulierten *nmt1* Promotors der Spalthefe stehen [*nmt* = 'no message with thiamine'] Hefen, die mit einem solchen Vektor transformiert werden, exprimieren das betreffende Fremdgen in Abhängigkeit von der jeweiligen Thiaminkonzentration im Kulturmedium der Hefe. Hierdurch läßt sich gegebenenfalls die Phase des Hefewachstums von der Phase der Produktion des Fremdproteins zeitlich trennen, so daß es prinzipiell auch möglich ist, für die Hefe toxische Proteine zur Expression zu bringen. Um gleichzeitig eine Sekretion und damit eine deutlich leichtere Reinigung der in *S. pombe* heterolog exprimierten Toxine WICALTIN und ZYGOCIN zu ermöglichen, haben wir bereits einen Expressions-/Sekretions-Vektor konstruiert [Vektor pTZ $\alpha$ / $\gamma$ ; siehe Beispiel 11], der das Sekretions- und Prozessierungssignal des viralen K28-Präprotoxingens enthält [Schmitt & Tipper, 1995] und dadurch eine effektive Sekretion des jeweils 'in-frame' nachgeschalteten Fremdproteins ermöglicht.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z.B. über Säulenchromatographie reinigen. Bevorzugt wird eine Affinitätsreinigung der Antikörper, bei der bei-

spielsweise das jeweilige Antigen (ZYGOCIN oder WICALTIN) kovalent an eine allgemein erhältliche CnBr-aktivierte Sepharose-Matrix gekoppelt und zur Reinigung der jeweils toxinspezifischen Antikörper eingesetzt wird.

5 Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293) hergestellt werden.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel, das die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die erfindungsgemäßen Polypeptide (einzeln oder in Kombination) und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bezogen auf Candida-Mykosen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen formuliert wird.

15 In Beispiel 12 ist ausgeführt, dass das von Stamm DSM 12865 produzierte und gereinigte Toxin WICALTIN sogar eine deutlich stärkere Toxizität auf Hefen besitzt, als die im Vergleich getesteten und zur Therapie von Mycosen häufig eingesetzten, topischen Antimycotika Clotrimazol und Miconazol.

20 Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Arzneimittel im obigen Sinne enthaltend ein Antimycotikum oder ein Proteintoxin erhältlich aus DSM 12864 und/oder DSM 12865 und/oder erfindungsgemäße Polypeptide mit antimycotischer Wirkung.

25 Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit Liposomen komplexierter Form enthält.

30 Als geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe eignen sich z.B. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren, Nukleaseinhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Diagnostikum enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe und ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bevozugt Candida-Mykosen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen versetzt werden.

Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Diagnostikum auf der Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR-Diagnostik, z.B. gemäß EP-0200362) oder eines Northern und/oder Southern Blots, wie in Beispiel 13 näher beschrieben, hergestellt werden. Diese Tests beruhen auf der spezifischen Hybridisierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit dem komplementären Gegenstrang üblicherweise der entsprechenden mRNA. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann hierbei auch modifiziert sein, wie z.B. in EP0063879 beschrieben. Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes DNA-Fragment mittels geeigneter Reagenzien, z.B. radioaktiv mit  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dATP oder nicht-radioaktiv mit Biotin, nach allgemein bekannten Methoden markiert und mit isolierter RNA, die vorzugsweise an geeignete Membranen aus z.B. Zellulose oder Nylon gebunden wurde, inkubiert. Zudem ist es vorteilhaft, die isolierte RNA vor der Hybridisierung und Bindung an eine Membran der Größe nach, z.B. mittels Agarose-Gelelektrophorese, aufzutrennen. Bei gleicher Menge an untersuchter RNA aus jeder Gewebeprobe kann somit die Menge an mRNA bestimmt werden, die spezifisch durch die Sonde markiert wurde.

Ein weiteres Diagnostikum enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunogenen Teile davon. Das Polypeptid bzw. Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z.B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit z.B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Antikörper reagieren zu können. Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen



werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

5

Ein anderes Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe des Menschen leicht und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid vorhanden ist. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Fungizid das die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäßen Polypeptide (einzeln oder in Kombination) und gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur Herstellung eines Fungizids zur Bekämpfung von Schadhefen und Schadpilzen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit landwirtschaftlich annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen formuliert wird.

15

20

Wie bereits beschrieben wird in einer bevorzugten Ausführungsform eine transgene Pflanze hergestellt, welche das erfindungsgemäße Proteintoxin exprimiert. Daher betrifft die Erfindung ebenfalls Pflanzenzellen sowie inhärent die transgene Pflanze als solche enthaltend die erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder Proteintoxine.

25

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft auch einen Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren, wie z.B. Inhibitoren oder Stimulatoren, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder die erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

30

Ein geeigneter Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren, insbesondere solcher, die in der sensitiven Hefezelle mit dem Proteintoxin ZYGOCIN nach SEQ ID

No 2 wechselwirken, ist z.B. das sogenannte "Two-Hybrid System" (Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286). Bei diesem Test wird eine Zelle, beispielsweise eine Hefezelle, mit einem oder mehreren Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert, die ein Fusionsprotein exprimieren, das das erfindungsgemäße Polypeptid und eine DNA-Bindedomäne eines bekannten Proteins, beispielsweise von Gal4 oder LexA aus *E. coli*, enthält und/oder ein Fusionsprotein exprimieren, das ein unbekanntes Polypeptid und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, beispielsweise von Gal4, Herpesvirus VP16 oder B42, enthält. Zudem enthält die Zelle ein Reportergen, beispielsweise das LacZ-Gen aus *E. coli*, "Green Fluorescence Protein" oder die Aminosäure-Biosynthesegene der Hefe His3 oder Leu2, das durch regulatorische Sequenzen, wie z.B. den lexA-Promotor/Operator oder durch eine sogenannte "Upstream Activation Sequence" (UAS) der Hefe kontrolliert wird. Das unbekannte Polypeptid wird beispielsweise durch ein DNA-Fragment kodiert, das aus einer Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, stammt. Üblicherweise wird gleich eine cDNA-Genbank mit Hilfe der beschriebenen Expressionsvektoren in Hefe hergestellt, so daß der Test unmittelbar danach durchgeführt werden kann.

Beispielsweise wird in einem Hefe-Expressionsvektor die erfindungsgemäße Nukleinsäure in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die LexA-DNA-Bindedomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und der LexA-DNA-Bindedomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. In einem anderen Hefe-Expressionsvektor werden cDNA-Fragmente aus einer cDNA-Genbank in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus einem unbekannten Polypeptid und der Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. Die mit beiden Expressionsvektoren transformierte Hefe, die beispielsweise Leu2<sup>-</sup> ist, enthält zusätzlich eine Nukleinsäure, die für Leu2 kodiert, und durch den LexA-Promotor/Operator kontrolliert wird. Im Falle einer funktionellen Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und dem unbekannten Polypeptid bindet die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne über die LexA-DNA-Bindedomäne an den LexA-Promotor/Operator, wodurch dieser aktiviert und das Leu2-Gen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, daß die Leu2<sup>-</sup> Hefe auf Minimalmedium, das kein Leucin enthält, wachsen kann.

Bei Verwendung des LacZ- bzw. "Green Fluorescence Protein"-Reportergens anstelle eines Aminosäure-Biosynthesegens kann die Aktivierung der Transkription dadurch nachgewiesen werden, daß sich blau- bzw. grün-fluoreszierende Kolonien bilden. Die Blau- bzw. Grünfluoreszenzfärbung läßt sich aber auch leicht im Spectrophotometer z.B. bei 585 nm im Falle einer Blaufärbung quantifizieren.

Auf diese Weise können Expressionsgenbanken leicht und schnell auf Polypeptide durchsucht werden, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid interagieren. Anschließend können die gefundenen neuen Polypeptide isoliert und weiter charakterisiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des "Two-Hybrid-Systems" ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem bekannten oder unbekannten Polypeptid durch weitere Substanzen, wie z.B. chemische Verbindungen. Auf diese Weise lassen sich auch leicht neue wertvolle chemisch synthetisierbare Wirkstoffe auffinden, die als Therapeutikum eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht nur auf ein Verfahren zum Auffinden von polypeptidartigen Interaktoren bestimmt, sondern erstreckt sich auch auf ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die mit dem oben beschriebenen Protein-Protein-Komplex interagieren können. Derartige peptidartige, wie auch chemische Interaktoren werden daher im Sinne der vorliegenden Erfindung als funktionelle Interaktoren bezeichnet, die eine inhibierende oder eine stimulierende Wirkung haben können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der Proteintoxine mittels Kultivierung und Sekretion der Proteintoxine in ein Medium, welches ein synthetisches Kulturmedium (BAVC-Medium) darstellt, das eine chromatographische Reinigung der sezernierten Toxine, beispielsweise mittels Ultrafiltration und Kationenaustausch-Chromatographie und/oder Affinitäts-Chromatographie an Laminarin-Sepharose und/oder Mannoprotein-Sepharose, wesentlich erleichtert [Vgl. Beispiel 1 sowie Anhang zu Beispielen]. Im Falle des von Stamm DSM 12865 produzierten und sezernierten WICALTINS läßt sich eine weitere Steigerung in der Toxinproduktion erreichen, wenn das Medium durch Zusatz von des pflanzlichen (und allgemein erhältlichen)  $\beta$ -1,3-D-Glukans Laminarin in einer

Endkonzentration von 1 % supplementiert wird. Wie in Beispiel 14 ausgeführt, führt der Zusatz von Laminarin zum Kulturmedium zu einer Induktion der WICALTIN-Produktion, die durch Northern-Analysen auf eine Induktion der Transkription zurückgeführt werden konnte.

5 Zur Produktion des von DSM 12864 sezernierten Toxins ZYGOCIN kann synthetisches B-Medium eingesetzt werden [Vgl. Radler et al., 1993].

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung ohne die Erfindung auf diese Beispiele zu begrenzen.

10

Beispiele

Beispiel 1:

**Isolierung, Anreicherung und Reinigung des anti-*Candida*-Toxins WICALTIN aus Kulturüberständen der Killerhefe *W. californica* Stamm 3/57 (DSM 12865)**

15 Das von der Killerhefe *W. californica* 3/57 sezernierte Killertoxin WICALTIN zeigt im Agardiffusionstest auf Methylenblau-Agar gegen sensitive Hefen eine optimale Hemmwirkung bei pH 4,7 und 20°C. In synthetischem Flüssigmedium zeigt die Killerhefe *W. californica* Stamm 3/57 eine maximale Toxinproduktion bei Kultivierung in BAVC-Medium (pH 4,7). Zur Toxinanreicherung wurde die Killerhefe zunächst für 24  
20 h in 5 ml YEPD-Medium bei 30°C unter Schütteln inkubiert, anschließend vollständig in 200 ml BAVC-Medium überführt und erneut 48 h bei 20°C auf dem Schüttler (140 Upm) kultiviert. Vier Hauptkulturen zu je 2,5 l BAVC-Medium (pH 4,7 in 5 l Erlenmeyer-Kolben) wurden mit der zweiten Vorkultur beimpft (1%-iges Inokulum) und fünf Tage bei 20°C unter leichtem Schütteln (60 Upm) bebrütet. Zur Konzentrierung  
25 des sezernierten Killertoxins wurde der zellfreie Kulturüberstand bei +4°C und einem Druck von 1 bar durch Ultrafiltration an Polysulfonsäure-Membranen ('EasyFlow' [Fa. Sartorius]; Ausschlußgrenze 10 kDa) 200-fach auf ein Volumen von 50 ml eingeeengt. Zur Entfernung niedermolekularer Verbindungen und Entsalzung des so gewonnenen Konzentrates wurde das Toxin über Nacht bei +4°C im Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 10-20 kDa) gegen 5 mM Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,7) dialysiert. Zur  
30 Lagerung des Toxinkonzentrates wurde das dialysierte Präparat über eine 0,2 µm Membran sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

Nachweis und Eichung der Toxinaktivität erfolgten im Agardiffusionstest auf Methylenblau-Agar (MBA; pH 4,7) gegen die sensitive Indikatorhefe *Saccharomyces cere-*

visiae 192.2d. Hierzu wurden vom Toxinkonzentrat logarithmische Verdünnungsstufen in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,7) hergestellt und zu jeweils 100 µl in zuvor ausgestanzte Löcher (Lochdurchmesser 9 mm) einer mit der sensitiven Indikatorhefe beimpften MBA-Platte ( $2 \times 10^5$  Zellen/ml) einpipettiert. Nach dreitägiger Bebrütung der Platten bei 20°C wurden die deutlich sichtbaren Hemmhöfe ausgemessen. Hierbei zeigte sich, daß zwischen dem Hemmhofdurchmesser und dem Logarithmus der Toxinkonzentration eine lineare Beziehung besteht. Einem (um den Lochdurchmesser korrigierten) Hemmhofdurchmesser von 20 mm wurde eine willkürliche Toxinaktivität von  $1 \times 10^4$  Einheiten/ml zugeordnet.

Die Reinigung des konzentrierten WICALTINS erfolgte entweder durch Kationenaustausch-Chromatographie an Bioscale-S (FPLC) oder durch Affinitäts-Chromatographie an einer epoxyaktivierten Sepharose-6B-Matrix (Fa. Pharmacia), an die zuvor das pflanzliche  $\beta$ -1,6-D-Glukan Pustulan gekoppelt wurde. Das auf diese Weise in seiner spezifischen Aktivität 625-fach angereicherte Toxinpräparat (Tabelle 1) war gelelektrophoretisch rein und zeigte nach SDS-PAGE (im 10-22%-igen Gradientengel) nur noch eine einzelne Bande bei etwa 37 kDa, die gleichermaßen mit Coomassie-Blau (Proteinfärbung) und Perjodsäure-Schiffs-Reagenz (PAS; Kohlenhydratfärbung) nachweisbar war. Die positive PAS-Färbung deutet auf eine potentielle N-Glykosylierung des anti-*Candida*-Toxins WICALTIN hin. Durch Behandlung des gereinigten Toxins mit Endoglykosidase-H konnte bestätigt werden, daß WICALTIN einen N-glykosidisch verknüpften Kohlenhydratanteil von etwa 3 kDa besitzt, der in dieser Größe in Hefe ebenfalls auf eine einzige N-Glykosylierungsstelle im Proteintoxin hindeutet. Da das deglykosylierte WICALTIN eine deutlich eingeschränkte Toxizität aufweist, kann gefolgert werden, daß der Kohlenhydratanteil von WICALTIN vermutlich für die Bindung an die sensitive Zielzelle notwendig ist und dadurch indirekt die biologische Aktivität des Toxins beeinflußt.

**Tabelle 1:** Anreicherung von WICALTIN aus dem Kulturüberstand der Killerhefe *Wiliopsis californica* [UF, Ultrafiltration]

Präparat	Volu- men	Gesamt- pr tein	Gesamt- Toxin- aktivität	Spezifi- sche To- xin-	Aktivitäts- ausbeute	Reini- gungs- faktor
----------	--------------	--------------------	--------------------------------	------------------------------	-------------------------	----------------------------

	[ml]	[mg]	[E]	aktivität [E/mg]	[%]	
Kultur- überstand	10000	24600	$7,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^1$	100	1
UF- Retentat	50	162	$6,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^3$	80	122
lyophil. Dialysat	25	45,8	$3,1 \times 10^5$	$6,8 \times 10^3$	39	213
Bio-Scale S (Katio- nen- austausch)	64	1,28	$2,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	3,2	625

Beispiel 2:

**Bestimmung der NH<sub>2</sub>-terminalen Aminosäuresequenz von WICALTIN und  
Nachweis einer enzymatischen  $\beta$ -1,3-Glucanase-Aktivität**

5 Durch N-terminale Aminosäuresequenzierung des gereinigten Killertoxins wurden die ersten zehn Aminosäuren bestimmt. Wie aus **Figur 1** zu erkennen ist, weist der N-Terminus von WICALTIN eine signifikante Homologie zum Aminoterminus der vom *BGL2* Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodierten Endo- $\beta$ -1,3-Glucanase auf.

10 Aufgrund der ermittelten Homologie von WICALTIN zu Bgl2 wurde untersucht, ob im ungereinigten Toxinkonzentrat sowie im gereinigten Toxinpräparat eine Glucanase-Aktivität nachweisbar ist. Sowohl im enzymatischen Test mit dem  $\beta$ -1,3-D-Glucan Laminarin als Substrat als auch im Fluoreszenztest mit 4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucosid (MUC) als Substrat konnte in den WICALTIN-Präparaten eine deutliche  $\beta$ -1,3-D-Glucanaseaktivität nachgewiesen werden; das ebenfalls getestete  $\beta$ -1,6-D-Glucan Pustulan wurde durch WICALTIN nicht hydrolysiert.

Beispiel 3:

**Überleben von WICALTIN-behandelter Hefe in Gegenwart und Abwesenheit von Zellwand-Glukanen: Kompetitionsanalysen**

Sensitive Hefezellen des Stammes *S. cerevisiae* 192.2d, die in YEPD-Flüssigmedium (pH 4,7) bei 20°C in Gegenwart von  $1 \times 10^5$  E/ml gereinigtem WICALTIN kultiviert werden, zeigten die in **Figur 2** dargestellte Abtötungskinetik. Durch Zusatz des pflanzlichen  $\beta$ -1,6-D-Glukans Pustulan konnte die Überlebensrate toxinbehandelter Hefezellen signifikant gesteigert werden und führte in Konzentrationen von 10 mg/ml zu einer vollständigen Aufhebung der WICALTIN-Toxizität. Im Unterschied zu Pustulan war das  $\beta$ -1,3-D-Glukan Laminarin nicht in der Lage, die Überlebensrate der toxinbehandelten Hefen zu steigern (**Figur 2**).

Die dargestellten Befunde lassen somit darauf schließen, daß die Wirkung von WICALTIN eine Bindung an  $\beta$ -1,6-D-Glukane erfordert, die als primäre Andockstellen (Toxinrezeptoren) der Hefezellwand fungieren. In Übereinstimmung hiermit konnte gezeigt werden, daß sich Hefen mit einer Deletion im chromosomalen *KRE1*-Genlocus toxinresistent verhalten und nach Retransformation mit einem *KRE1*-tragenden episomalen Vektor wieder toxinsensitiv werden (**Figur 3**). In *kre1* Mutanten beruht die Toxinresistenz auf einem deutlich verringerten  $\beta$ -1,6-D-Glukangehalt und einer dadurch bedingten Verringerung der zur letalen Wirkung notwendigen Toxinbindung an die Hefezelloberfläche.

#### Beispiel 4:

#### Wirkungs- und Abtötungsspektren von WICALTIN

Im Agardiffusionstest zeigte das gereinigte *W. californica* Toxin WICALTIN eine ausgeprägte Toxizität gegen die in **Tabelle 2** dargestellten Hefen. Mit Ausnahme von drei Stämmen der Hefe *Candida krusei* wurden alle 22 getesteten, klinischen Patientenisolat sowie alle weiteren Kontrollstämme humanpathogener *Candida*-Arten sehr effektiv durch WICALTIN abgetötet. Mit 14 toxinsensitiven Hefearten aus insgesamt 10 verschiedenen Gattungen zeigt WICALTIN ein für Killertoxine ungewöhnlich breites Wirkungsspektrum.

**Tabelle 2:** Wirkungsspektrum von WICALTIN auf pathogene und apathogene Hefen unterschiedlicher Gattungen. Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA; pH 4,7) gegen gereinigtes WICALTIN getestet. Die applizierte Toxinaktivität betrug in allen Fällen  $1 \times 10^6$  E/ml. Der Stamm *C. tropicalis* (Patientennummer 541965)

stammte von dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universitätsklinik Mainz.

Hefestamm	Phänotyp	Hemmhofdurchmesser [mm]
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	S	11
<i>C. glabrata</i> NCYC 388	S	12
<i>C. krusei</i> 185	R	0
<i>C. tropicalis</i> Patientennummer 541965	S	11
<i>Debaryomyces hansenii</i> 223	S	16
<i>Hanseniaspora uvarum</i> ATCC 64295	R	0
<i>Hasegawaea japonica</i> var. <i>Versa-</i> <i>tilis</i> 191	R	0
	S	22
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2359/152		
<i>K. marxianus</i> C 8,1	R	0
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> K/3I B6	S	8
<i>Pichia anomala</i> 245	S	17
<i>P. farinosa</i> 258	R	0
<i>P. jadinii</i> 251	S	6
<i>P. kluyveri</i> ATCC 64301	R	0
<i>P. membranaefaciens</i> NCYC 333	R	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 192.2d	S	30
381	S	23
ATCC 42017 (K1-Superkiller)	S	19
NCYC 738 (K2-Killer)	S	14
452 (= NCYC 1006)	S	16
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> 240	R	0
<i>Schizosaccharomyces pomb</i>	R	0



CBS1042		
<i>Sporothrix spec.</i> 1129	S	11
<i>Torulospora delbrueckii</i> 208	S	18
<i>T. pretoriensis</i> 186	S	10
<i>Yarrowia lipolytica</i> 271	S	8
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 412	S	23

Beispiel 5:

**Klonierung, Sequenzierung und molekulare Charakterisierung des WICALTIN-codierenden *WCT*-Gens der Hefe *W. californica* Stamm 3/57 (DSM 12865)**

Aufbauend auf der N-terminalen Aminosäuresequenz von WICALTIN wurden spezifische DNA-Oligonukleotide hergestellt, die zur Identifizierung und Klonierung sowie zur molekularbiologischen Charakterisierung des chromosomal lokalisierten Toxins *WCT* führten. Die DNA-Sequenz von *WCT* (SEQ ID No. 1) zeigt einen einzelnen offenen Leserahmen, der für ein potentiell N-glykosyliertes Protein aus 309 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 34.017 Da kodiert. Untersuchungen zur Wirkung des *WCT*-kodierten Killertoxins machten deutlich, daß es sich bei WICALTIN um ein für Hefen äußerst toxisches Glykoprotein handelt, dessen primäres "target" die in Hefen vorkommenden Zellwand- $\beta$ -1,3-D-Glukane sind. Seine selektive Toxizität auf Hefen und Pilze beruht darauf, daß WICALTIN in der sensiblen Zielzelle die Struktur und/oder Integrität der Zellwand zerstört und Hefen somit an ihrer empfindlichsten Stelle angreift und letztlich auch abtötet.

Beispiel 6:

**Anreicherung und Reinigung des Virustoxins ZYGOCIN aus Kulturüberständen der Killerhefe *Z. bailii* Stamm 412 (DSM 12864)**

Das viruskodierte Killertoxin ZYGOCIN der Hefe *Z. bailii* Stamm 412 wurde entsprechend der von Radler *et al.* (1993) beschriebenen Methode aus dem Kulturüberstand der Killerhefe isoliert, durch Ultrafiltration konzentriert und schließlich durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Die in vorliegender Studie entwickelte Reinigung von ZYGOCIN in nur einem Schritt nutzt die natürliche Affinität des Toxins zu Zellwand-Mannoproteinen sensibler Hefen. Das nach einer von Schmitt & Radler (1997) beschriebenen Methode aus *S. cerevisiae* Stamm 192.2d isolierte und teilge-

reinigtes Mannoprotein wurde kovalent an eine epoxyaktivierte Sepharose-6B-Matrix (Fa. Pharmacia) gekoppelt und mittels FPLC zur säulenchromatographischen Toxinreinigung eingesetzt. Nach SDS-PAGE zeigte das in dieser Weise gereinigte, biologisch hoch aktive ZYGOCIN eine einzelne Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 10 kDa (Figur 4).

Beispiel 7:

#### Wirkungs- und Abtötungsspektrum von ZYGOCIN

Das im Agardiffusionstest bestimmte Wirkungsspektrum des viralen ZYGOCINS der Hefe *Z. bailii* 412 (DSM 12864) umfaßt pathogene und apathogene Hefegattungen, von denen *Candida albicans* und *Sporothrix schenckii* als Krankheitserreger bei Mensch und Tier, und *Ustilago maydis* und *Debaryomyces hansenii* als Schadhefen in der Landwirtschaft und im Lebensmittelbereich gefürchtet sind (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Wirkungsspektrum von ZYGOCIN auf pathogene und apathogene Hefen unterschiedlicher Gattungen. Alle Stämme wurden im Agardiffusionstest (MBA; pH 4,5) gegen ein ZYGOCIN-Präparat mit einer Aktivität von  $1 \times 10^4$  E/ml getestet.

ZYGOCIN-sensitive Hefen	Relativer Grad der Sensitivität
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++
<i>Candida albicans</i>	+
<i>Candida krusei</i>	++
<i>Candida glabrata</i>	++
<i>Candida vinii</i>	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	++
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+
<i>Ustilago maydis</i>	++
<i>Debaryomyces hansenii</i>	++
<i>Pichia anomala</i>	++
<i>Pichia jadinii</i>	+
<i>Pichia membranefaciens</i>	+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	++

Beispiel 8:

**Klonierung und Sequenzierung des ZYGOCIN-codierenden ZBT-Gens (ZBT) der Hefe *Z. bailii* Stamm 412 (DSM 12864)**

Die cDNA-Synthese des toxcodierenden Doppelstrang-RNA-Genoms der Killerhefe *Z. bailii* 412 erfolgte in Anlehnung an die von Schmitt (1995) beschriebene Methode mit gereinigter, durch Methylquecksilberhydroxid denaturierter M-dsRNA als Matritze und verschiedenen Hexanukleotiden als 'Primern'. Nach Ligation in den EcoRI-restringierten Vektor pUC18, Transformation in *E. coli* und Isolierung der rekombinanten Plasmide konnten mehrere cDNA-Klone identifiziert und sequenziert werden. Die cDNA-Sequenz des ZYGOCIN-kodierenden Leserasters (SEQ ID No 2) enthält die genetische Information für ein Vorläuferprotein (Pro-Toxin) aus 238 Aminosäuren, welches in Aminosäureposition RR<sup>139</sup> eine potentielle Kex2-Endopeptidase-Spaltstelle trägt. Durch die *in vivo* im späten Golgi-Stadium erfolgende Kex2-vermittelte Pro-ZYGOCIN-Prozessierung entsteht das biologisch aktive ZYGOCIN, dessen Molekulargewicht (10 kDa; 99 Aminosäuren) und N-terminale Aminosäuresequenz exakt mit den für das gereinigte ZYGOCIN ermittelten Werten übereinstimmen.

Eine heterologe Expression der ZBT-cDNA in der Hefe *S. cerevisiae* führte aufgrund der Toxizität von ZYGOCIN dazu, daß sich die transformierten Hefen durch ihr eigenes Toxin abtöteten. In Zukunft wird eine heterologe ZYGOCIN-Expression in der toxinresistenten Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* angestrebt, da wie am Beispiel des viralen K28-Toxins bereits gezeigt werden konnte, daß sich die Spalthefe besonders gut zur Expression und Sekretion von Fremdproteinen eignet.

Beispiel 9:

**Expression der Toxingene WCT und ZBT in transgenen Pflanzen**

Da die beschriebenen Killertoxine WICALTIN und ZYGOCIN ein breites Wirkungsspektrum besitzen und auch pflanzenpathogene Hefen und Pilze abtöten, sollte es möglich sein transgene Pflanzen zu konstruieren, die sich beispielsweise gegenüber einer Infektion mit dem Mais-pathogenen Erreger *Ustilago maydis* resistent verhalten. Ähnliche Versuche wurden bereits an Tabak-Pflanzen durchgeführt, die durch heterologe Expression des natürlicherweise viral kodierten Killertoxins KP4 von *U. maydis* in der Lage waren, das betreffende Killertoxin zu sezernieren und dadurch einen spezifischen Schutz gegen Infektionen mit bestimmten phytopathogenen

Stämmen von *U. maydis* aufbauten (Park et al., 1996; Kinal et al., 1995; Bevan, 1984). Aufbauend auf kommerziell erhältlichen Transformationssystemen, die auf modifizierten Derivaten des natürlichen Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* beruhen, können die von uns klonierten Toxingene *WCT* und *ZBT* in sogenannte bidirektionale pBI-Vektoren (Fa. CLONTECH) einkloniert und zur Herstellung transgener Pflanzen eingesetzt werden. Die betreffenden Toxingene *WCT* und *ZBT* werden hierzu unter Transkriptionskontrolle des starken Blumenkohl-Mosaikvirus-Promotors (CaMV-P) gebracht. Der Aufbau der zu konstruierenden Vektoren ist in **Figur 5** schematisch dargestellt.

Beispiel 10:

**Heterologe Expression des WICALTIN-kodierenden *WCT*-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) in *S. cerevisiae***

Zur heterologen Expression des *WCT*-Gens in der Hefe *S. cerevisiae* wurde das WICALTIN-kodierende *WCT*-Gen als 930 bp *EcoRI/SmaI*-Fragment in den allgemein erhältlichen 2 $\mu$  Vektor pYX242 einkloniert. Der resultierende Vektor pSTH2 (**Figur 6**) enthält das Toxingen unter Transkriptionskontrolle des hefeeigenen Triose-Phosphat-Isomerase-Promotors (*TPI*) und ermöglicht dadurch nach Transformation in Hefe (*S. cerevisiae*) eine konstitutive Expression von WICALTIN. Eine gelelektrophoretische Analyse des Kulturüberstandes der auf diese Weise erhaltenen Hefetransformanten zeigte, daß das rekombinante WICALTIN in das Außenmedium sezerniert wird und eine dem homologen WICALTIN (aus Wildtyp-Stamm DSM 12865) entsprechende  $\beta$ -1,3-D-Glukanase-Aktivität besitzt (**Figur 6**).

Beispiel 11:

**Versuche zur heterologen Expression von WICALTIN und ZYGOCIN in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe***

Da sich die Spaltheife sowohl als intakte Zelle als auch als zelwandfreier Sphaeroplast resistent gegen WICALTIN und ZYGOCIN verhält, ist sie als Wirt zur heterologen Expression der betreffenden Toxine geeignet. Um zu gewährleisten, daß die rekombinanten Toxine von der Spaltheife nicht nur exprimiert, sondern gleichzeitig auch in den intrazellulären Sekretionsweg eingeschleust und damit in das Außenmedium sezerniert werden, wurde ein Vektor konstruiert (pTZ $\alpha/\gamma$ ; **Figur 7**), der

ein in *S. pombe* funktionelles Sekretions- und Prozessierungs-Signal (S/P) trägt, welches aus der cDNA des viralen K28-Präprotoxingens der Hefe *S. cerevisiae* stammt [Vgl. Schmitt, 1995; Schmitt & Tipper, 1995]. Das Sekretions- und Prozessierungssignal gewährleistet, daß das jeweils 'in-frame' nachgeschaltete Fremdprotein in der Spalthefe in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums importiert und damit in den Sekretionsweg der Hefe eingeschleust wird. Durch die am C-Terminus der S/P-Region vorhandene Kex2p-Spaltstelle wird das gewünschte Fremdprotein in einem späten Golgi-Kompartiment durch die hefeeigene Kex2p-Endopeptidase von seinem intrazellulären 'Transport-Vehikel' abgespalten und kann schließlich als biologisch aktives Protein (ZYGOCIN und/oder WICALTIN) in das Außenmedium sezerniert werden.

Beispiel 12:

**Vergleichende biologische Aktivitäten von gereinigtem WICALTIN und der topischen Antimycotika Clotrimazol und Miconazol**

Da gereinigtes WICALTIN ein breites Wirkungsspektrum besitzt und auch humanpathogene Hefen und/oder Pilze effektiv abtötet, kommt ihm eine Bedeutung als potentiell Antimycotikum zu. Daher wurden mit WICALTIN vergleichende Studien zu den derzeit sehr häufig eingesetzten topischen Antimycotika Clotrimazol und Miconazol durchgeführt. Zunächst wurde die toxische Wirkung von Clotrimazol und Miconazol im MBA-Agardiffusionstest gegen *Sporothrix spec.* als Indikatorhefe getestet. Hierzu wurde Clotrimazol in einer Konzentration von 10 mg/ml in Ethanol (96%) gelöst; diese Stammlösung wurde mit H<sub>2</sub>O bidest verdünnt und in Konzentrationen von 0,1 bis 10 mg/ml zu je 100 µl im MBA-Test eingesetzt. Der Hemmhofdurchmesser lag bei einer eingesetzten Menge von 10-50 µg Clotrimazol zwischen 12 und 32 mm. Von Miconazol wurde eine Stammlösung von 100 µg/ml in DMSO (100%) hergestellt, die in gleicher Weise wie Clotrimazol im MBA-Test auf biologische Aktivität gegen *Sporothrix spec.* untersucht wurde. Der Einsatz von 0,08-0,3 µg Miconazol führte im 'Bioassay' zu Hemmhöfen zwischen 22 und 36 mm. Die biologischen Aktivitäten von 10 µg Clotrimazol bzw. von 0,08 µg Miconazol entsprechen somit der Toxizität von 2 µg gereinigtem WICALTIN. Ein auf das Molekulargewicht der drei getesteten Verbindungen basierender Vergleich zeigt, daß WICALTIN bereits in einer Konzentration von 0,07 pmol die gleiche Aktivität zeigt wie 0,2 pmol Miconazol

und 29 pmol Clotrimazol; bei WICALTIN handelt es sich somit um ein überaus wirksames Antimycotikum (**Figur 8**).

Beispiel 13:

**Nachweis des WICALTIN-kodierenden WCT-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) durch Southern-Hybridisierung mit genspezifischen DNA-Sonde.**

Zum Nachweis, daß die Nukleinsäure nach **SEQ ID No. 1** zur Herstellung einer WICALTIN-spezifischen DNA-Sonde für eine anschließende Southern-Hybridisierung eingesetzt werden kann, wurde eine DIG-markierte, 930 bp lange DNA-Sonde zum Nachweis des in den Vektor pSTH1 einklonierten WCT-Gens eingesetzt. Der konstruierte Vektor pSTH1 repräsentiert ein Derivat des allgemein erhältlichen, prokaryotischen Klonierungsvektors pBR322.

Die in **Figur 9** dargestellte Agarosegelelektrophorese und der entsprechende Southern-Blot zeigen zweifelsfrei, daß mit der hergestellten Nukleinsäuresonde, das WICALTIN-kodierende WCT-Gen nachgewiesen werden kann.

Beispiel 14:

**Northern-Blot Analyse zum Nachweis einer Transkriptions-Induktion des WICALTIN-kodierenden WCT-Gens der Hefe *Williopsis californica* 3/57 (DSM 12865) durch  $\beta$ -1,3-D-Glukane**

Zum Nachweis einer  $\beta$ -1,3-D-Glukan-induzierten WCT-Transkription wurde der Hefestamm DSM 12865 in 300 ml BAVC-Medium bzw. in BAVC-Medium mit Zusatz von 0,03 % des pflanzlichen  $\beta$ -1,3-D-Glukans Laminarin für 48 h bei 20°C und leichtem Schütteln (60 Upm) kultiviert und nach unterschiedlichen Zeiten zur Präparation der Gesamt-RNA eingesetzt. Alle Proben (10 ml) wurden vor der RNA-Isolierung auf eine gleiche Zellzahl von  $1,8 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt und in denaturierenden Agarose-Formaldehydgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Wie aus **Figur 10** zu erkennen ist, konnte sowohl unter nicht-induzierenden Bedingungen (BAVC-Medium ohne Zusatz) als auch im Laminarin-supplementierten BAVC-Medium für das WCT-Transkript eine Größe von 1.100 Basen nachgewiesen werden. Ohne Glukanzusatz wurde gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase (nach 19 h) eine maximale WCT-Expression erreicht; die in der stationären Wachstumsphase deutlich schwächer werdenden Hybridisierungssignale deuten auf eine abgeschwächte Tran-

skription hin. Unter induzierenden Kulturbedingungen (in Gegenwart von Laminarin) zeigte das *WCT*-Transkript nach 10 h eine deutlich höhere Intensität als in der nicht-induzierten Kultur, so daß gefolgert werden kann, daß die Transkription des *WICALTIN*-kodierenden *WCT*-Gens durch Zusatz von  $\beta$ -1,3-D-Glukanen induziert werden kann.

#### Anhang Beispiele:

##### Verwendete Medien und Lösungen in den Beispielen:

###### a.) BAVC-Medium

Glucose 50 g/l

D,L-Malat 20 g/l

tri-Natriumcitrat 0,5 g/l

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 g/l

MgSO<sub>4</sub> 1,0 g/l

CaCl<sub>2</sub> 0,5 g/l

myo-Inosit 0,04 g/l

Aminosäure-Stammlösung (10 x) 200 ml/l

Spurenelemente-Stammlösung (100 x) 10 ml/l

Vitamin-Stammlösung (100 x) 20 ml/l

Mit:

###### b.) Aminosäure-Stammlösung (10 x)

Alanin 0,75 g/l

Argininmonohydrochlorid 3,5 g/l

Asparaginsäure 0,5 g/l

Glutaminsäure 3 g/l

Histidiniummonochlorid 0,2 g/l

Methionin 0,4 g/l

Serin 0,5 g/l

Threonin 2 g/l

Tryptophan 0,4 g/l

## c.) Spurenelement-Stammlösung (100 x)

	Borsäure	200 mg/l
	FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	200 mg/l
5	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	200 mg/l
	AlCl <sub>3</sub>	200 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	100 mg/l
	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	100 mg/l
10	KJ	100 mg/l
	Kaliumhydrogentartrat	2 g/l

## d.) Vitamin-Stammlösung (100 x)

15	4-Aminobenzoessäure	20 mg/l
	Biotin	2 mg/l
	Folsäure	2 mg/l
	Nicotinsäure	100 mg/l
	Pyridoxolhydrochlorid	100 mg/l
20	Riboflavin	50 mg/l
	Thiaminiumdichlorid	50 mg/l
	Ca-D-Panthothenat	100 mg/l

Biotin: in 5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/50 ml Aqua dest. lösen.

25 Folsäure: in 50 ml Aqua dest. unter Zusatz von einigen Tropfen verdünnter NaOH lösen.

Riboflavin: in 500 ml Aqua dest. und einigen Tropfen HCl unter Erwärmen lösen.

Die übrigen Vitamine sind in wenig Aqua dest. löslich.

30 Der pH-Wert des BAVC-Mediums wurde durch Zusatz von KOH auf pH 4,7 eingestellt. Glucose und Stammlösungen wurden getrennt voneinander sterilisiert. Aminosäure-, Vitamin- und Spurenelement-Stammlösungen wurden 20 Minuten im strömenden Dampf bei 100°C sterilisiert und danach dem autoklavierten BAVC-Medium zugesetzt.



## Figuren und die wichtigsten Sequenzen

**SEQ ID No. 1:** DNA- und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des WCT-kodierten Proteintoxins WICALTIN der Hefe *Williopsis californica* Stamm 3/57.

**SEQ ID No. 2:** cDNA- und abgeleitete Aminosäure-Sequenz des ZBT-kodierten Proteintoxins ZYGOCIN der Hefe *Z. bailii*

**Figur 1:** N-terminale Aminosäuresequenzen des *W. californica* Toxins WICALTIN und der Endo- $\beta$ -1,3-Glucanase Bgl2 der Hefe *S. cerevisiae*. Im Fettdruck ist die einzige Abweichung der ansonsten identischen Teilsequenzen dargestellt (Bgl2p-Sequenz nach Klebl & Tanner, 1989)

**Figur 2:** Abtötungskinetik WICALTIN-behandelter Zellen der sensitiven Hefe *S. cerevisiae* 192.2d in Gegenwart (2a) und Abwesenheit (2b) der  $\beta$ -D-Glukane Laminarin (L) und Pustulan (P). Das eingesetzte Toxin hatte eine Gesamtaktivität von  $4,0 \times 10^5$  E/ml bei einer spezifischen Aktivität von  $4,2 \times 10^5$  E/mg Protein.

**Figur 3 (a,b,c,d):** Agardiffusionstest zum Nachweis einer WICALTIN-Sensitivität /Resistenz in  $Kre1^+$  und  $Kre1^-$  Stämmen der Hefe *S. cerevisiae*. Durch Transformation der WICALTIN-resistenten *kre1* Nullmutante *S. cerevisiae* SEY6210[ $\Delta kre1$ ] mit dem *KRE1*-tragenden Vektor pPGK[*KRE1*] wird die volle WICALTIN-Sensitivität wiederhergestellt.

**Figur 4:** (A) Gelelektrophoretische Analyse (SDS-PAGE) des von der Hefe *Z. bailii* Stamm 412 (DSM 12864) produzierten und sezernierten ZYGOCINS nach Affinitäts-Chromatographie an Mannoprotein-Sepharose. (B) Agardiffusionstest zum Nachweis der biologischen Aktivität des gereinigten Killertoxins ZYGOCIN.

**Figur 5:** Schematischer Aufbau eines ZBT- bzw. WCT-tragenden Expressionsvektors zur Herstellung transgener Pflanzen.

[Erklärungen: RB, LB: 'right and left border'-Sequenzen des natürlichen Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens*; CaMV-P: 35S Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus; NOS-P, NOS-T: Transkriptions-Promotor und -Terminator der Nopal-

Synthase; kan<sup>R</sup>: Kanamycin-Resistenzgen aus *Streptococcus* zur Selektion in *E. coli*; NPT-II: Neomycin-Phosphotransferasegen aus dem Transposon Tn5 zur Selektion in Pflanze].

**Figur 6:** (A) Partielle Restriktionskarte des episomalen Vektors pSTH2 zur heterologen Expression des WICALTIN-kodierenden Toxingens *WCT* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Vektor pSTH2 ist ein konstruiertes Plasmid auf der Basis des kommerziell erhältlichen 2  $\mu$  Multi-Copy-Vektors pYX242, in welches das *WCT*-Gen aus Stamm DSM 12865 als 930 bp *EcoRI*/*SmaI*-Fragment einkloniert wurde. Das betreffende Toxingen steht unter Transkriptionskontrolle des hefeeigenen *TPI*-Promotors und ermöglicht dadurch nach Transformation in *S. cerevisiae* eine starke und konstitutive Expression von WICALTIN.

(B) Gelelektrophoretische Analyse (SDS-PAGE; 10-22,5 %-iges Gradientengel) konzentrierter Kulturüberstände von *S. cerevisiae* nach Transformation mit dem konstruierten WICALTIN-Expressionsvektor pSTH2 (Spur 1) und dem Grundvektor pYX242 (Spur 2). Das in *S. cerevisiae* heterolog exprimierte WICALTIN ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

(C) Nachweis einer extrazellulären  $\beta$ -1,3-D-Glukanase-Aktivität der Hefe *S. cerevisiae* nach Transformation mit dem WICALTIN-exprimierenden Hefektor pSTH2. Zur Bestimmung der Exo- $\beta$ -1,3-D-Glukanase-Aktivität wurden die auf leucinfreiem SC-Agar kultivierten Hefekolonien mit 0,04% 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Glucosid (MUG) in 50 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5,2) besprüht. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurden die Agarplatten mit UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) bestrahlt. Die Glukanase-Aktivität wurde aufgrund der MUG-Hydrolyse durch Fluoreszenz nachgewiesen.

[Erklärungen: 1 und 4, *S. cerevisiae* transformiert mit einem Vektor (pEP-WCT), der das WICALTIN-kodierende *WCT*-Gen unter dessen eigenem Promotor exprimiert; 2, Wildtyphefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865); 3, Wildtyphefe *W. californica* 3/111; 5, *S. cerevisiae* nach Transformation mit dem WICALTIN exprimierenden Vektor pYX-WCT; 6, *S. cerevisiae* transformiert mit dem Grundvektor pYX242 (ohne Toxingen)]

**Figur 7:** Schema des strukturellen Aufbaus des Vektors pTZ $\alpha/\gamma$  zur heterologen Expression und Sekretion von Fremdproteinen (insbesondere von WICALTIN und ZYGOCIN) in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*.

[Erklärungen: P<sub>nmt1</sub>, T<sub>nmt1</sub>, Transkriptions-Promotor und -Terminator des Thiamin-regulierten *nmt1* Gens der Spaltheife *S. pombe*; S/P, Sekretions- und Prozessierungssequenz des viralen K28-Präprotoxins der Sproßhefe *S. cerevisiae*; *ars1*, autonom replizierende Sequenz aus Chromosom 1 der Spaltheife; *leu2*, Leucin-2-Markergen zur Selektion Leucin-prototropher Transformanten von *S. pombe*]

**Figur 8:** Vergleichende biologische Aktivitäten von gereinigtem WICALTIN, Clotrimazol und Miconazol; die angegebenen molaren Mengen erzeugen im 'Bioassay' (Agardiffusionstest) gegen die sensitive Indikatorhefe *Sporothrix spec.* einen Hemmhof-Durchmesser von 12 mm.

**Figur 9:** Nachweis des in pSTH1 (pBR322-Derivat) einklonierten WICALTIN-kodierenden *WCT*-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) durch Agarosegelelektrophorese (A) und Southern-Hybridisierung mit einer DIG-markierten *WCT*-Sonde (B).

[Erklärungen: M, DIG-markierter DNA-Längenstandard II; Spur 1, pSTH1 restringiert mit *EcoRI* und *SalI*; Spur 2, DNA-Marker 'Smart-Ladder']

**Figur 10:** Northern-Analyse zur Transkriptions-Induktion des WICALTIN-kodierenden *WCT*-Gens der Hefe *W. californica* 3/57 (DSM 12865) unter nicht-induzierenden Kulturbedingungen in BAVC-Medium (A) und unter induzierenden Bedingungen in BAVC-Medium mit Zusatz von 0,03 % Laminarin (B). Die elektrophoretische Auftrennung der aus Stamm DSM 12865 isolierten Gesamt-RNA erfolgte in einem denaturierenden Agarose/Formaldehyd-Gel bei konstanter Spannung (7 V/cm). Die RNA wurde auf einer Nylonmembran gegen eine WICALTIN-spezifische, DIG-markierte DNA-Sonde (630 bp) hybridisiert und durch Chemilumineszenz detektiert.

[Erklärungen: M, DIG-markierter RNA-Längenstandard I; Spuren 1-8 entsprechen den Zeitpunkten der Probennahme zur Isolierung der Gesamt-RNA: Spur 1, 10 h;

Spur 2, 15 h; Spur 3, 19 h; Spur 4, 24 h; Spur 5, 33 h; Spur 6, 38 h; Spur 7, 43 h;  
Spur 8, 48 h]

Im Text verwendete Abkürzungen:

WCT	<u>Williopsis Californica Toxin</u>
ZBT	<u>Zygosaccharomyces Bailii Toxin</u>
ZYGOCIN	Eigenname; sezerniertes Toxin aus DSM 12864
WICATIN	Eigenname; sezerniertes Toxin aus DSM 12865

Hinterlegungen

Folgende im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Mikroorganismen wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Maschenroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapester Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt (Hinterlegungsnummer; Hinterlegungsdatum):

<i>Williopsis californica</i> Stamm 3/57	(DSM 12865)	(09.06.1999)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> Stamm 412	(DSM 12864)	(09.06.1999)

Literaturnachweise

**Anaissie, E. (1992).** Opportunistic mycoses in the immuno compromised host: experience at a cancer center and review. *Clin. Infect. Dis.* 14:43-51.

**Bevan, E.A. & M. Makower (1963).** The physiological basis of the killer character in yeast. *Proc. Int. Congr. Genet.* XI:1202-1203.

**Bevan, M. (1984).** Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8720.

**Bussey, H. (1991).** K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol. Microbiol.* 5:2339-2343.

**Cameron, M.L., Schell, W.A., Bruch, S., Bartlett, J.A., Waskin, H.A. & J.R. Perfect (1993).** Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2449-2453.

**Chavenet, P., Lopez, J., Grappin, M., Bannin, A., Duomg, M., Waldner, A., Buisson, M., Camerlynck, P. & H. Portier (1994).** Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and in vitro-in vivo correlation in HIV-infected patients. *AIDS* 8:945-950.

**Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D. & D.Y. Thomas (1991).** Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol. Gen. Genet.* 227:127-136.

**Hanes, S.D., Burn, V.E., Strley, S.L., Tipper, D.J. & D.Y. Thomas (1986).** Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1675-1679.

**Hector, R.F. (1993).** Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:1-21.

**Hodgson, V.J., Button, D. & G.M. Walker (1995).** Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol.* 141:2003-2012.

**Kinal, H., Park, C.M., Berry, J., Koltin, Y. & J.A. Bruenn (1995).** Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell* 7:677-688.

**Klebl, F. & W. Tanner (1999).** Molecular cloning of a cell wall exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171:6259-6264.

Komijama, T., Shirai, T., Ohta, T., Urakami, H., Furuichi, Y. & Y. Ohta (1998). Action properties of HYI killer toxin from *Williopsis saturnus* var. *saturnus*, and antibiotics, aculeacin A and paulacandin B. *Biol. Pharm. Bull.* 21:1013-1019.

Kurz, M.B. (1998). New antifungal drug targets: a vision for the future. *ASM News* 64:31-39.

Levy, J.A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infections. *Microbiol. Rev.* 57:183-289.

Maenza, J.R., Keruly, J.C., Moore, R.D., Chaisson, R.E., Merz, W.G. & J.E. Galant (1996). Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* 173:219-225.

McCracken, D.A., Martin, V.J., Stark, M.J.R. & P.L. Bolen (1994). The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia accaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiol.* 140:425-431.

Meunier, F., Aoun, M. & N. Bitar (1992). Candidemia in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 14:120-125.

Mrsa, V., Klebl, F. & W. Tanner (1993). Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- $\beta$ -1,3-glucanase. *J. Bacteriol.* 175:2102-2106.

Neuhausen, F. & M.J. Schmitt (1996). Transgenic expression of a toxin-coding killer virus of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a possible function of "cryptic" mycoviruses in the evolution of their hosts. In: Transgenic Organisms and Biosafety: Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA, and Expression of Transgenes, Schmidt, E.R. & Th. Hankeln (eds), 117-124, Springer-Verlag.

Park, C.M., Banerjee, N., Koltin, Y. & J.A. Bruenn (1996). The *Ustilago maydis* virally encoded KP1 killer toxin. *Mol. Microbiol.* 20:957-963.

Park, C.M., Berry, J.O. & J.A. Bruenn (1996). High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 30:359-366.

Pfaller, M.A., Chalberg, J.R., Redding, S.W., Smith, J., Farinacci, G., Fothergill, A.W. & M.G. Rinaldi (1994). Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 32:59-64.

Pfeiffer, P., Radler, F., Caspritz, G. & H. Hänel (1988). Effect of a killer toxin of yeast on eukaryotic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1068-1069.

Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernardis, F. & G. Morace (1986). Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathology* 96:103-107.

Radler, F., Herzberg, S., Schöning, I. & P. Schwarz (1993). Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol.* 139:495-500.

5 Rex, J.H., Rinaldi, M.G. & M.A. Pfaller (1995). Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 39:1-8.

Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A. & H. Bussey (1994). Characterization of the yeast (1-6)- $\beta$ -glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the *PKC1* pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell. Biol.* 127:567-579.

10 Schmitt, M.J. & D.J. Tipper (1990). K28, a new double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:4807-4815.

Schmitt, M.J. & D.J. Tipper (1992). Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast* 8:373-384.

15 Schmitt, M.J. & D.J. Tipper (1995). Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an  $\alpha/\beta$  heterodimeric protein toxin. *Virology* 213:341-351.

Schmitt, M.J. & F. Neuhausen (1994). Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Zygosaccharomyces bailii* and *Hanseniaspora uvarum*. *J. Virol.* 68:1765-1772.

20 Schmitt, M.J. & F. Radler (1987). Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* 133:3347-3354.

Schmitt, M.J. & F. Radler (1988). Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin K28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170:2192-2196.

25 Schmitt, M.J. & F. Radler (1995). Mycoviren und Hefe-Killertoxine erlauben Einblicke in die Zellbiologie. *Forschungsmagazin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz* 2:86-96.

Schmitt, M.J. & F. Radler (1996). dsRNA-Viren codieren Killertoxine bei der Hefe *Saccharomyces*. *BioEngineering* 2:30-34.

30 Schmitt, M.J. & G. Schernikau (1997). Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 35:281-285.

**Schmitt, M.J. & P. Compain (1995).** Killer toxin resistant *kre12* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K1 membrane receptor. *Arch. Microbiol.* 164:435-443.

**Schmitt, M.J. (1995).** Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 246:236-246.

**Schmitt, M.J., Brendel, M., Schwarz, R. & F. Radler (1989).** Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast killer toxin K28. *J. Gen. Microbiol.* 135:1529-1535.

**Schmitt, M.J., Klavehn, P., Wang, J., Schöning, I. & D.J. Tipper (1996).** Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiol.* 142:2655-2662.

**Schmitt, M.J., Poravou, O., Trenz, K. & K. Rehfeldt (1997).** Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J. Virol.* 71:8852-8855.

**Schmitt, M.J., Poravou, O., Trenz, K. & K. Rehfeldt (1997).** Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J. Virol.* 71:8852-8855.

**Schründer, J., Meinhardt, F., Rohe, M. & J. Kämper (1994).** Lineare Plasmide bei Mikroorganismen - Genetische Grundlagen und potentielle Anwendungen. *BioEngineering* 10:29-39.

**Tipper, D.J. & M.J. Schmitt (1991).** Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol. Microbiol.* 5:2331-2338.

**Troillet, N., Durussel, C., Bille, J., Glauser, M.P. & J.P. Chave (1993).** Correlation between in vitro susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12:911-915.

**Walker, G.M., McLeod, A.H. & V.J. Hodgson (1995).** Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 127:213-222.

**Wickner, R.B. (1993).** Double-stranded RNA virus replication and packaging. *J. Biol. Chem.* 268:3797-3800.

**Wingard, J.R. (1995).** Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin. Infect. Dis.* 20:115-125.



## Patentansprüche

1. Proteintoxine erhältlich aus *Williopsis californica* und/oder *Zygosaccharomyces bailii*.
2. Proteintoxine nach Anspruch 1, erhältlich aus DSM 12864 und/oder DSM 12865.
3. Proteintoxine nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese eine antimycotische und / oder fungizide Wirkung inne haben.
4. Proteintoxin nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit der Aktivität einer Glucanase.
5. Proteintoxin nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es an  $\beta$ -1,6-D-Glukane bindet und  $\beta$ -1,3-D-Glucanase- und/oder  $\beta$ -1,3-Glucanosyltransferase-Aktivität besitzt.
6. Nukleinsäure kodierend für eine Glucanase und/oder für ein Proteintoxin gemäß einer der Ansprüche 1-5 mit einer Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID No 1** oder **SEQ ID No 2** oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei **SEQ ID No 1** oder **SEQ ID No 2** Teil des Anspruchs ist.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA ist.
8. Nukleinsäure nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß **SEQ ID No 1** von Basenposition 1 bis 951 oder **SEQ ID No 2** von Basenposition 1 bis 717 ist, wobei **SEQ ID No 1** oder **SEQ ID N 2** Teil des Anspruchs ist.

- 5 9. Nukleinsäure nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine oder mehrere regulatorische Regionen (Promotor, 'Enhancer', Terminator) und/oder eine 3'-terminale PolyA-Sequenz und/oder eine zur intrazellulären Pro-Toxinprozessierung notwendige Kex2p-Endopeptidase-Spaltstelle und/oder eine oder mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen enthält.
10. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 8-9 erhältlich aus DSM 12864 und/oder DSM 12865.
- 10 11. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.
- 15 12. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6-10 dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
- 20 13. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß **SEQ ID No 1** oder **SEQ ID No 2** oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
- 25 14. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Ansprüchen 1-5 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-11 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.
- 30 15. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13.
16. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 7 immunisiert und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.
17. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 oder Antikörper

gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls pharmazeutisch annehmbare Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

5 18. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bevozugt *Candida*-Mykosen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6 -10 oder ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfs-  
10 stoff formuliert wird.

15 19. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfs-  
stoffe.

20 20. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Mycosen, wie oberflächliche, kutane und subkutane Dermatomykosen, Schleimhaut- und Systemmykosen, besonders bevozugt *Candida*-Mykosen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.

25 21. Test zur Identifizierung von funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 oder Antikörper gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

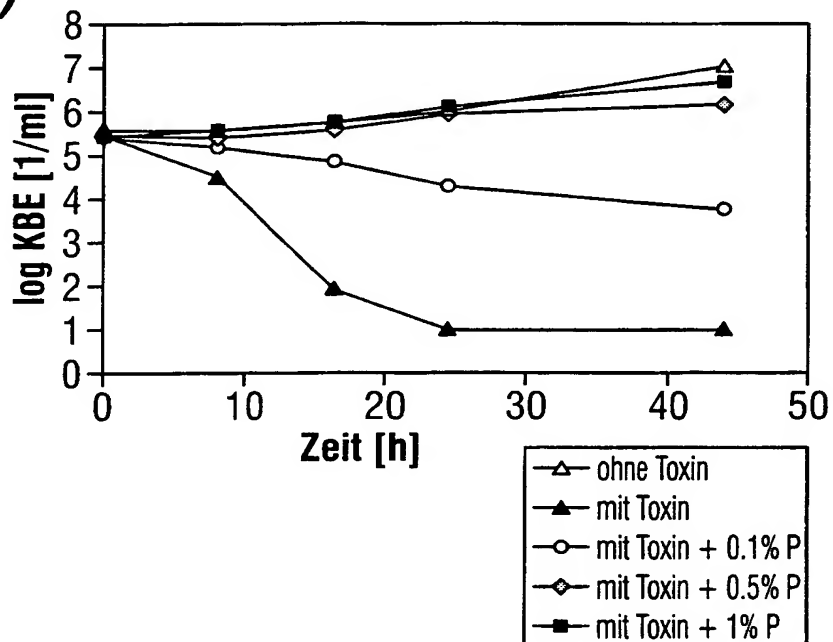
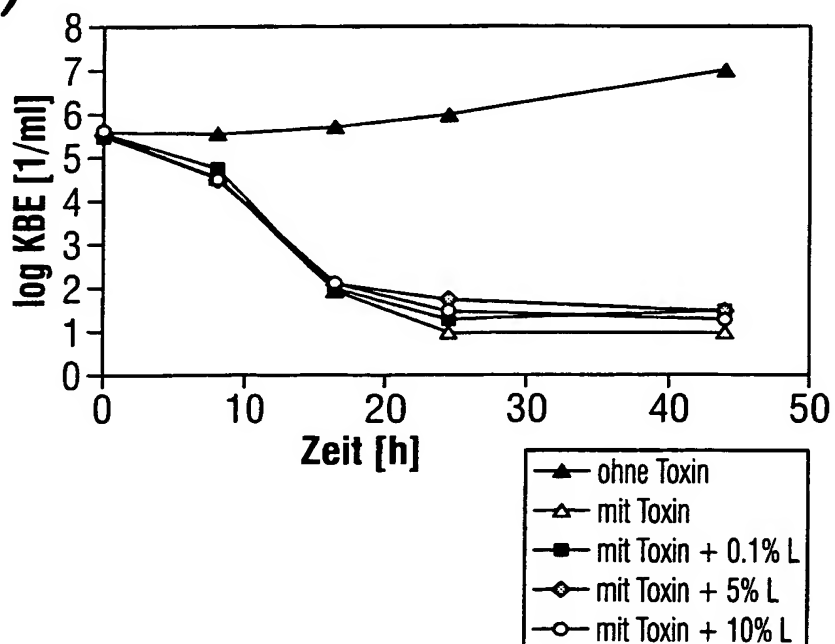
30 22. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 oder eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 zur Identifizierung funktioneller Interaktoren.

23. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 6-10 zum Auf-  
finden von Varianten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Genbank mit der ge-  
nannten Nukleinsäure abgesucht und die gefundene Variante isoliert wird.
- 5 24. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1-5 und 13 zur  
Bekämpfung von Schadhefen und Pilzen in Lebens- und Futtermittel.
- 10 25. Verfahren zur Kultivierung von DSM 12864 und DSM 12865, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß diese in synthetischem B- und/oder BAVC-Medium kultiviert  
werden.
26. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einer der Ansprüche 6-11 zur Herstel-  
lung von transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen.

**Fig. 1**

**WICALTIN:** NH<sub>2</sub>-Ile-Gly-**Gln**-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....

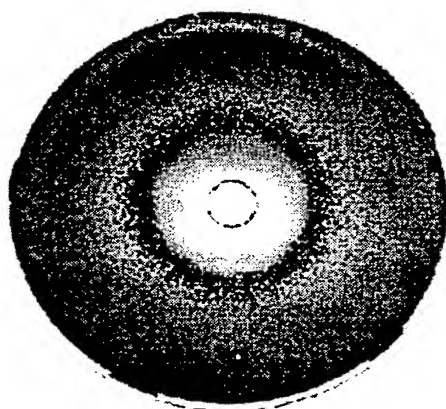
**Bgl2:** NH<sub>2</sub>-Ile-Gly-**Glu**-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-.....

**Fig. 2****2a)****2b)**

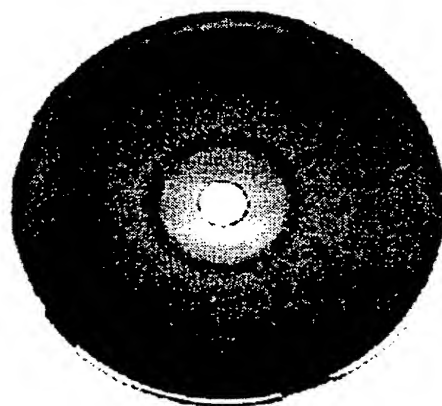


***Fig. 3*****(a)**

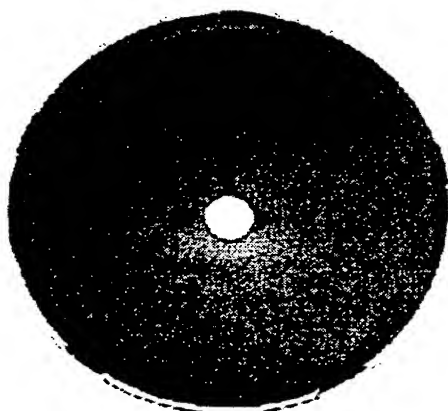
*S. cerevisiae* 192.2 d  
(*kre1*<sup>+</sup>)

**(b)**

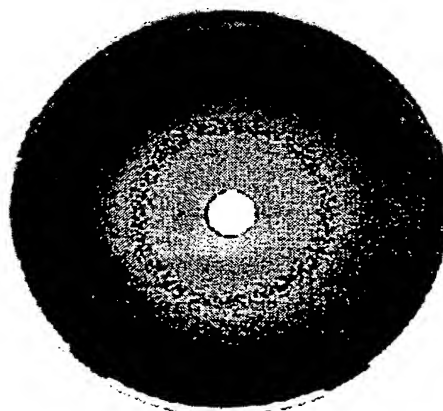
*S. cerevisiae* SEY6210  
(*kre1*<sup>+</sup>)

**(c)**

*S. cerevisiae* SEY6210[□*kre1*]  
mit pPGK[*KRE1*]  
(*kre1*<sup>-</sup>)

**(d)**

*S. cerevisiae* SEY6210[□*kre1*]  
(*kre1*<sup>+</sup>)





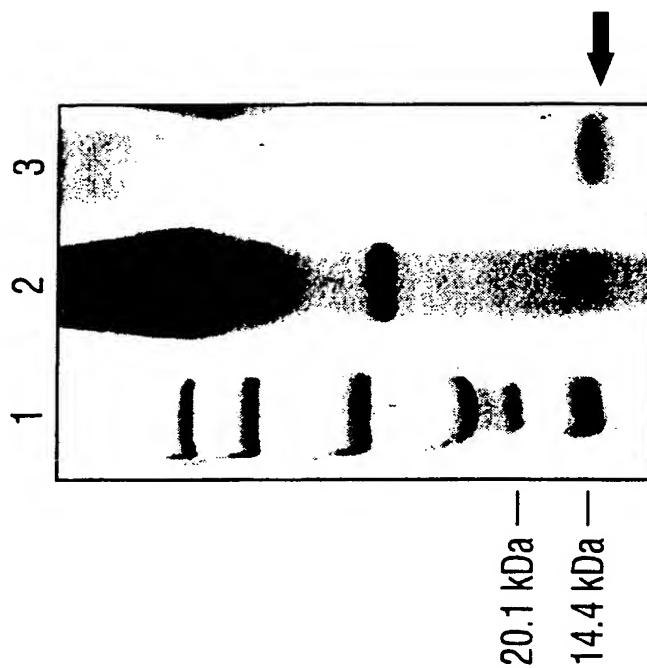
.

.

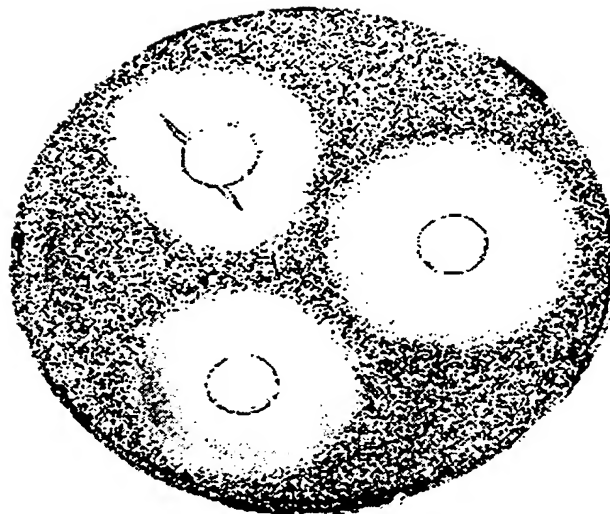
.

.



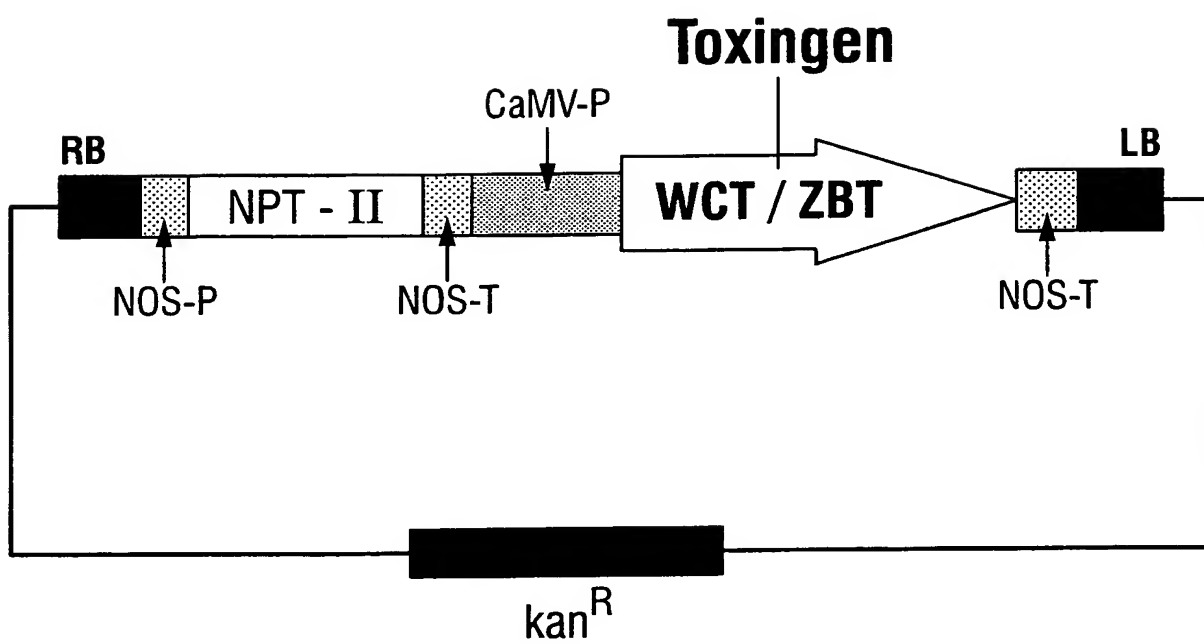
**Fig. 4****(A)**

SDS-PAGE von Zygocin vor und nach Affinitätschromatographie an Mannoprotein-Sepharose. Eingesetzt wurde eine Mannoprotein-Matrix zur Aufreinigung von Zygocin.  
[1: LMW-Marker (Bio-Rad); 2: Durchlauf (an Matrix nicht gebundene Proteine); 3: Eluiertes Toxin]

**(B)**

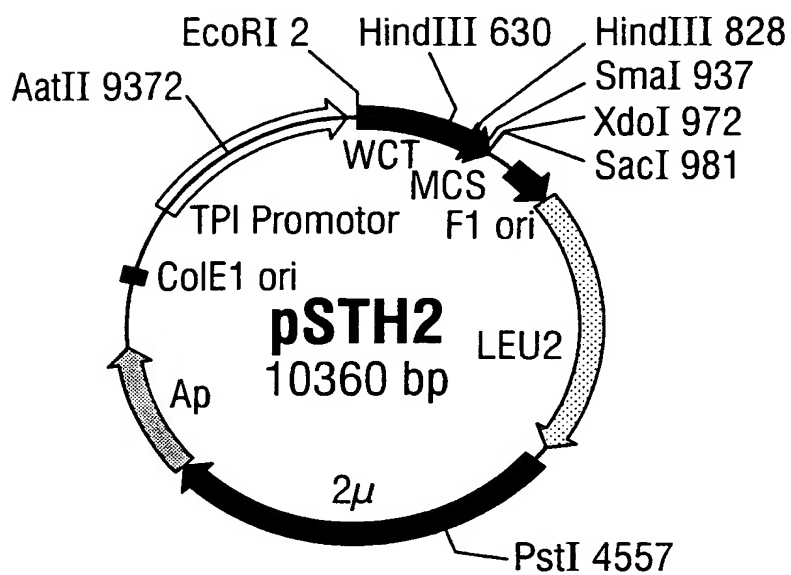
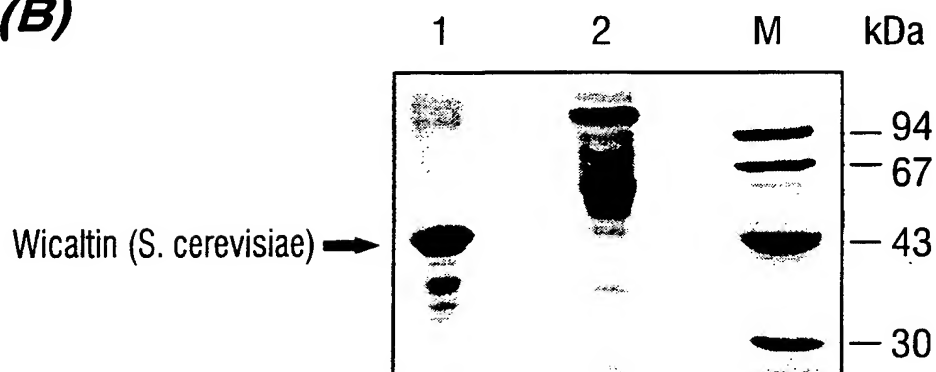
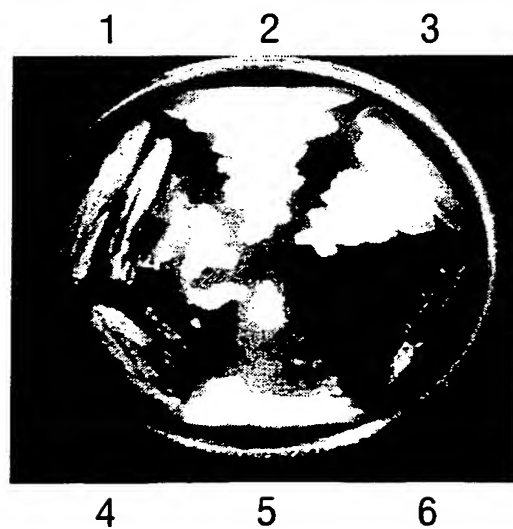
MBA-Test mit affinitätschromatographisch gereinigtem Zygocin. Als sensibler Organismus wurde *S. cerevisiae* 192.2d verwendet.  
A: Eluat, 15-fach konzentriert;  
B: Eluat, dialysiert; C: Eluat, in Elutionspuffer.



***Fig. 5***

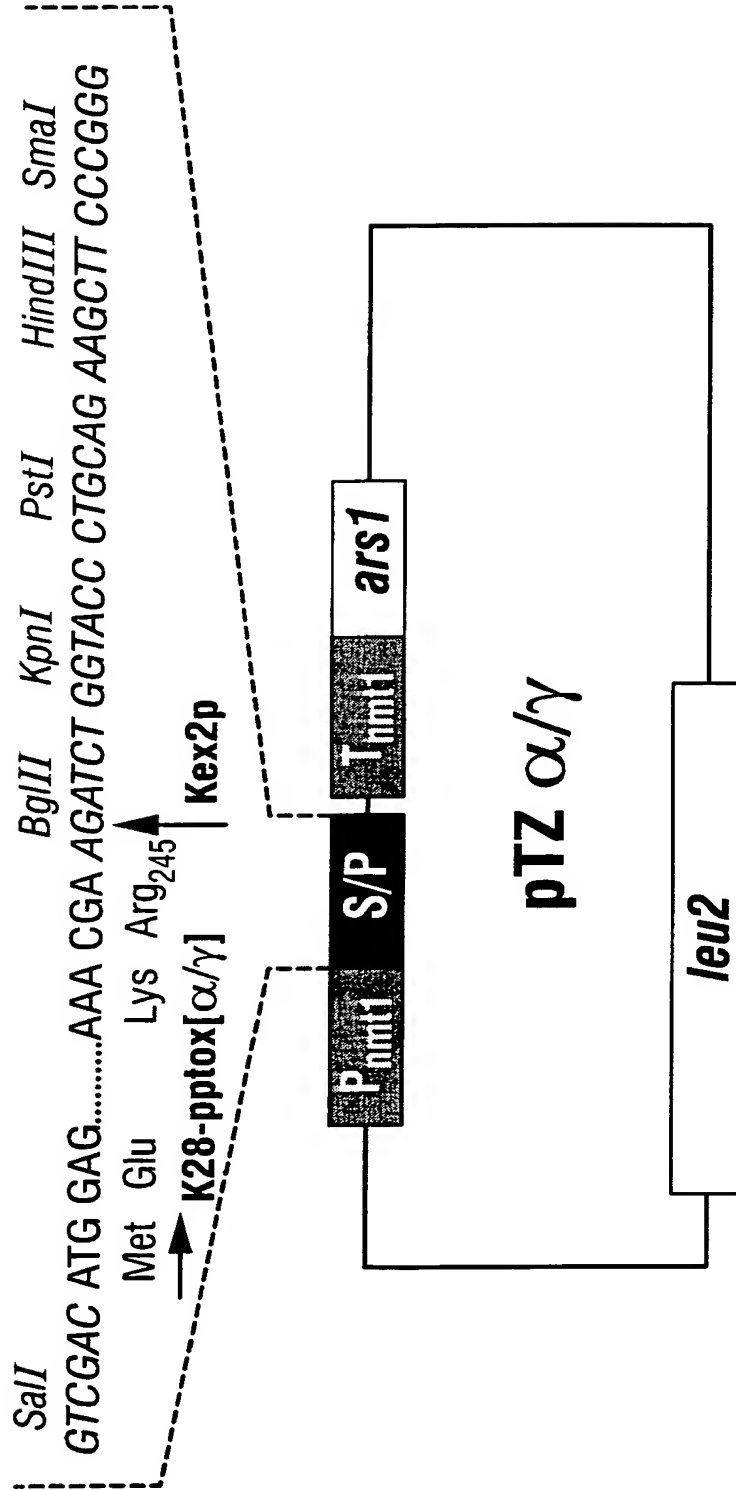


5 / 9

**Fig. 6****(A)****(B)****(C)**



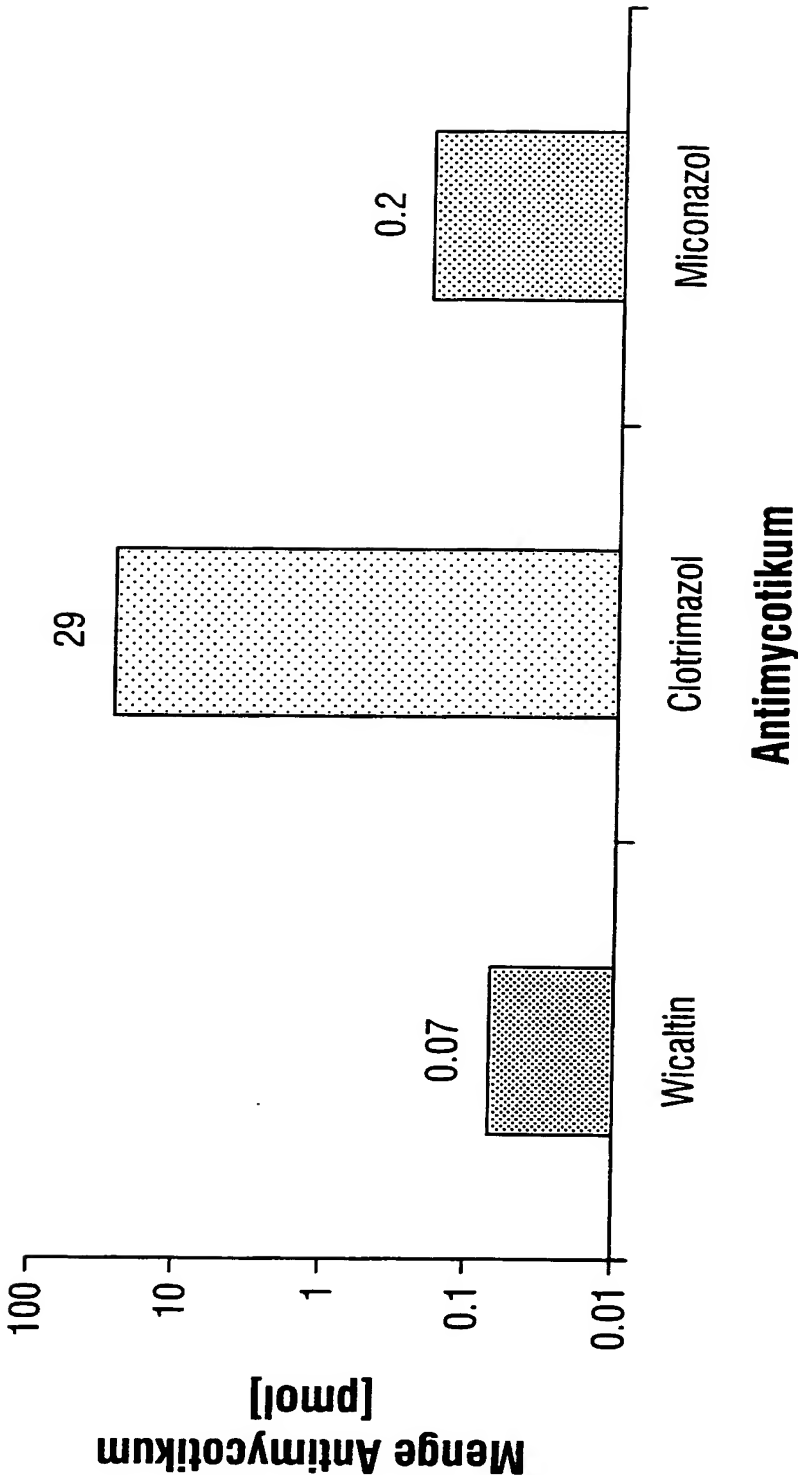
**Fig. 1**







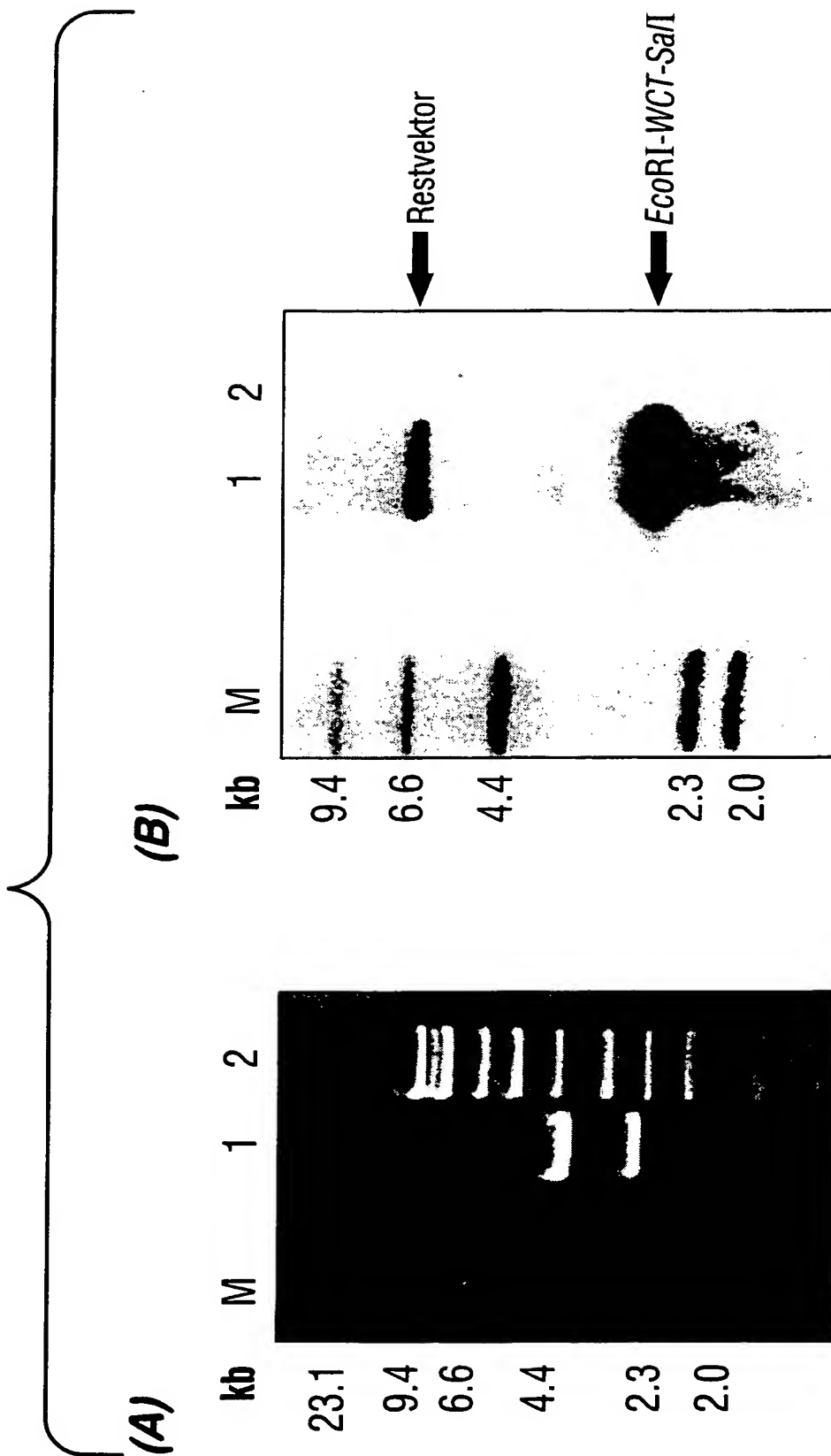
**Fig. 8**





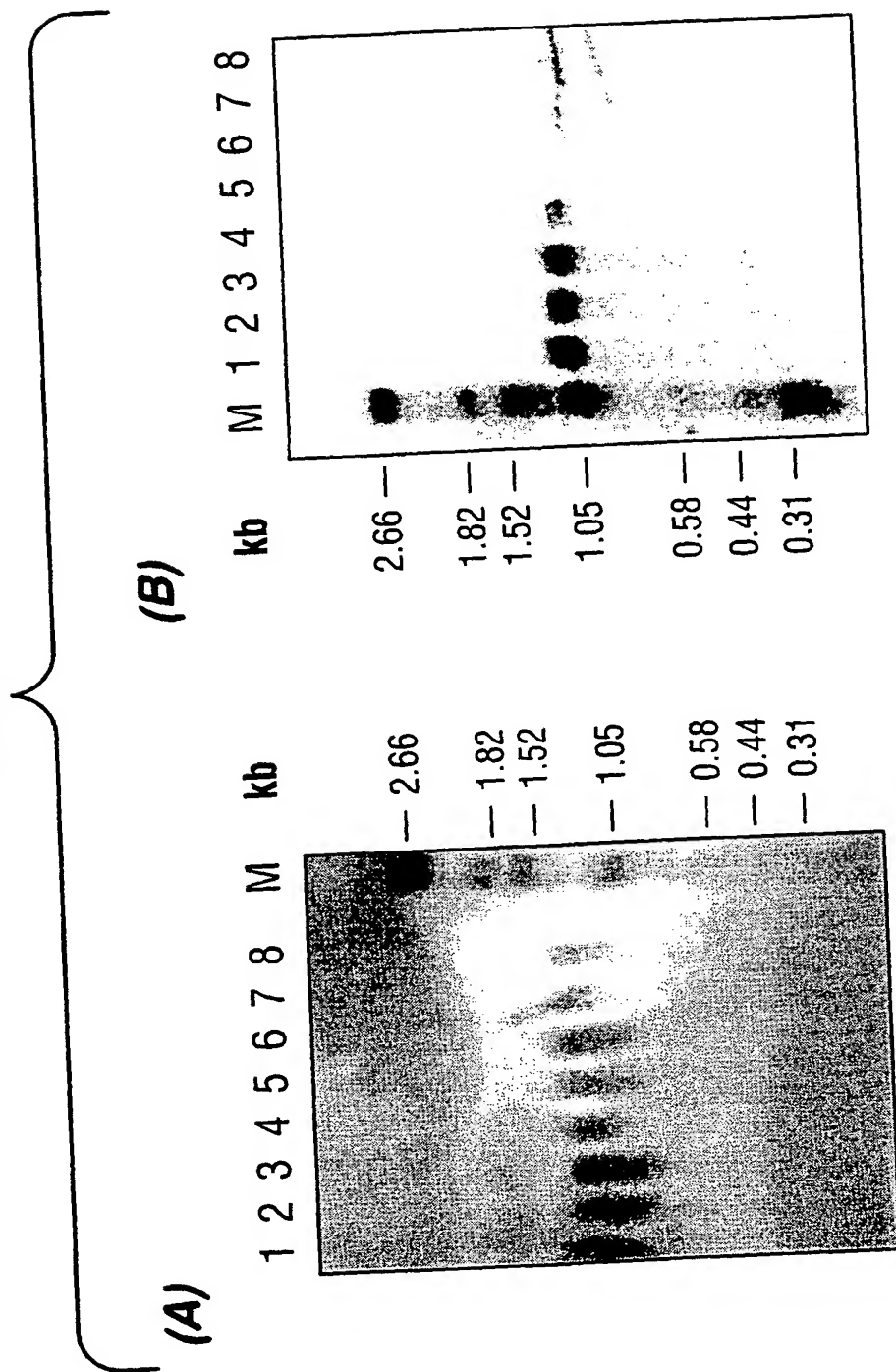
8 / 9

**Fig. 9**





**Fig. 10**





## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Aventis Research &amp; Technologies GmbH &amp; Co KG

<120> Neue Antimycotika und Fungizide, Verfahren zu deren  
Herstellung und Verwendung

&lt;130&gt; 99F028

&lt;140&gt; 19930959.0

&lt;141&gt; 1999-07-05

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 930

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Williopsis californica

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(930)

&lt;400&gt; 1

atg cgt ttc act aca ctc gtt gcc ctc gca ggt gcc att tcc tca gtc	48
Met Arg Phe Thr Thr Leu Val Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ser Ser Val	
1 5 10 15	
 cag gcc atc ggc caa cta gct ttt aac ttg ggt gtc aag gat aac tca	96
Gln Ala Ile Gly Gln Leu Ala Phe Asn Leu Gly Val Lys Asp Asn Ser	
20 25 30	
 ggt cag tgc aag act gcc tca gag tac aag gat gac ttg tct acc ctt	144
Gly Gln Cys Lys Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Asp Asp Leu Ser Thr Leu	
35 40 45	
 tca ggc tac aca tct aag gtt aga gtc tac gct gcc tca gac tgt aac	192
Ser Gly Tyr Thr Ser Lys Val Arg Val Tyr Ala Ala Ser Asp Cys Asn	
50 55 60	
 act ttg cag act ttg ggt cca gtt gtc gaa gag gct ggc ttc tca ttt	240
Thr Leu Gln Thr Leu Gly Pro Val Val Glu Glu Ala Gly Phe Ser Phe	
65 70 75 80	
 ttc gtt ggt att tgg cca aac gat gat gct cac ttc cag gaa gag caa	288
Phe Val Gly Ile Trp Pro Asn Asp Asp Ala His Phe Gln Glu Glu Gln	





85	90	95	
gac gct ttg aaa act tat ttg cca aag att aag aga tcc aca gtg gag			336
Asp Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Arg Ser Thr Val Glu			
100	105	110	
gcc ttc act gtt ggt tct gag gcc ttg tat aga gat gat atg act gct			384
Ala Phe Thr Val Gly Ser Glu Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Met Thr Ala			
115	120	125	
caa gag ttg gct gac aga atc aaa act att aga gag ttg gtt gcc act			432
Gln Glu Leu Ala Asp Arg Ile Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val Ala Thr			
130	135	140	
att gac gac tcc gaa ggt aac tca tat gct ggt att cca gtt ggt ttc			480
Ile Asp Asp Ser Glu Gly Asn Ser Tyr Ala Gly Ile Pro Val Gly Phe			
145	150	155	160
gtt gac tcc tgg aac gtt ttg gtt gat ggt gct tct cac cca gct att			528
Val Asp Ser Trp Asn Val Leu Val Asp Gly Ala Ser His Pro Ala Ile			
165	170	175	
gtt gag gct gat gtt gtg ttc gcc aat gct ttc tct tac tgg caa ggt			576
Val Glu Ala Asp Val Val Phe Ala Asn Ala Phe Ser Tyr Trp Gln Gly			
180	185	190	
cag act cag cag aac tcg tca tac tct ttc ttt gac gac att atg caa			624
Gln Thr Gln Gln Asn Ser Ser Tyr Ser Phe Phe Asp Asp Ile Met Gln			
195	200	205	
gct ttg caa acc att caa act gct aag ggt gag aca gat atc act ttc			672
Ala Leu Gln Thr Ile Gln Thr Ala Lys Gly Glu Thr Asp Ile Thr Phe			
210	215	220	
tgg gtt ggt gag acc ggc tgg cca acc gat ggt act cac ttt gaa gac			720
Trp Val Gly Glu Thr Gly Trp Pro Thr Asp Gly Thr His Phe Glu Asp			
225	230	235	240
tct gtc cca tct gtt gag aat gct cag acc ttc tgg aaa gat gcc gtc			768
Ser Val Pro Ser Val Glu Asn Ala Gln Thr Phe Trp Lys Asp Ala Val			
245	250	255	
tgt gcc att aga ggt tgg ggt atc aat gtt att gcc ttt gag gcc ttt			816
Cys Ala Ile Arg Gly Trp Gly Ile Asn Val Ile Ala Phe Glu Ala Phe			
260	265	270	
gac gaa gct tgg aag cca gat acc tct ggt acc tct gat gtg gaa aag			864
Asp Glu Ala Trp Lys Pro Asp Thr Ser Gly Thr Ser Asp Val Glu Lys			



275                                      280                                      285  
 tac tgg ggt gtt tgg gac tct aac agc aag ttg aag tat gat ttg tcc      912  
 Tyr Trp Gly Val Trp Asp Ser Asn Ser Lys Leu Lys Tyr Asp Leu Ser  
 290                                      295                                      300  
  
 tgt gac ttt acc tct tag    930  
 Cys Asp Phe Thr Ser  
 305                                      310  
  
 <210> 2  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Williopsis californica  
  
 <400> 2  
 Met Arg Phe Thr Thr Leu Val Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ser Ser Val  
 1                                      5                                      10                                      15  
  
 Gln Ala Ile Gly Gln Leu Ala Phe Asn Leu Gly Val Lys Asp Asn Ser  
 20                                      25                                      30  
  
 Gly Gln Cys Lys Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Asp Asp Leu Ser Thr Leu  
 35                                      40                                      45  
  
 Ser Gly Tyr Thr Ser Lys Val Arg Val Tyr Ala Ala Ser Asp Cys Asn  
 50                                      55                                      60  
  
 Thr Leu Gln Thr Leu Gly Pro Val Val Glu Glu Ala Gly Phe Ser Phe  
 65                                      70                                      75                                      80  
  
 Phe Val Gly Ile Trp Pro Asn Asp Asp Ala His Phe Gln Glu Glu Gln  
 85                                      90                                      95  
  
 Asp Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Arg Ser Thr Val Glu  
 100                                      105                                      110  
  
 Ala Phe Thr Val Gly Ser Glu Ala Leu Tyr Arg Asp Asp Met Thr Ala  
 115                                      120                                      125  
  
 Gln Glu Leu Ala Asp Arg Ile Lys Thr Ile Arg Glu Leu Val Ala Thr  
 130                                      135                                      140  
  
 Ile Asp Asp Ser Glu Gly Asn Ser Tyr Ala Gly Ile Pro Val Gly Phe  
 145                                      150                                      155                                      160  
  
 Val Asp Ser Trp Asn Val Leu Val Asp Gly Ala Ser His Pro Ala Ile



165 170 175  
 Val Glu Ala Asp Val Val Phe Ala Asn Ala Phe Ser Tyr Trp Gln Gly  
 180 185 190  
 Gln Thr Gln Gln Asn Ser Ser Tyr Ser Phe Phe Asp Asp Ile Met Gln  
 195 200 205  
 Ala Leu Gln Thr Ile Gln Thr Ala Lys Gly Glu Thr Asp Ile Thr Phe  
 210 215 220  
 Trp Val Gly Glu Thr Gly Trp Pro Thr Asp Gly Thr His Phe Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Ser Val Pro Ser Val Glu Asn Ala Gln Thr Phe Trp Lys Asp Ala Val  
 245 250 255  
 Cys Ala Ile Arg Gly Trp Gly Ile Asn Val Ile Ala Phe Glu Ala Phe  
 260 265 270  
 Asp Glu Ala Trp Lys Pro Asp Thr Ser Gly Thr Ser Asp Val Glu Lys  
 275 280 285  
 Tyr Trp Gly Val Trp Asp Ser Asn Ser Lys Leu Lys Tyr Asp Leu Ser  
 290 295 300  
 Cys Asp Phe Thr Ser  
 305

<210> 3  
 <211> 717  
 <212> DNA  
 <213> Zygosaccharomyces bailii

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(717)

<400> 3  
 atg aaa gca gcc caa ata tta aca gca agt ata gta agc tta ttg cca 48  
 Met Lys Ala Ala Gln Ile Leu Thr Ala Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro  
 1 5 10 15  
 ata tat act agt gct aga aac ata tta gac aga gaa tac aca gca aac 96  
 Ile Tyr Thr Ser Ala Arg Asn Ile Leu Asp Arg Glu Tyr Thr Ala Asn  
 20 25 30



gaa tta aaa act gct ttt gga gat gaa gaa att ttt aca gat ttg acg	144
Glu Leu Lys Thr Ala Phe Gly Asp Glu Glu Ile Phe Thr Asp Leu Thr	
35 40 45	
tat cac att cac gtt aac gtc agt ggc gaa att gac tct tac tat cat	192
Tyr His Ile His Val Asn Val Ser Gly Glu Ile Asp Ser Tyr Tyr His	
50 55 60	
aat tta gtc aat ttt gtc gat aac gct cta gca aac aaa gat att aat	240
Asn Leu Val Asn Phe Val Asp Asn Ala Leu Ala Asn Lys Asp Ile Asn	
65 70 75 80	
aga tat ata tac gct ata ttt aca cag cag aca aac tat aca gag gat	288
Arg Tyr Ile Tyr Ala Ile Phe Thr Gln Gln Thr Asn Tyr Thr Glu Asp	
85 90 95	
ggg ctc att gag tac tta aat cat tac gat tca gag act tgc aaa gat	336
Gly Leu Ile Glu Tyr Leu Asn His Tyr Asp Ser Glu Thr Cys Lys Asp	
100 105 110	
atc att act cag tat aat gtt aac gta gac act agt aac tgt ata agc	384
Ile Ile Thr Gln Tyr Asn Val Asn Val Asp Thr Ser Asn Cys Ile Ser	
115 120 125	
aat act aca gat caa gct aga ctc caa cgt cgc gga ggg tgg gtg aac	432
Asn Thr Thr Asp Gln Ala Arg Leu Gln Arg Arg Gly Gly Trp Val Asn	
130 135 140	
cca cat tgt agt ggt gat aac tta gcc gat act agc gat tgt tgt aac	480
Pro His Cys Ser Gly Asp Asn Leu Ala Asp Thr Ser Asp Cys Cys Asn	
145 150 155 160	
ttg gct tat aac aag att aac ccc tct tca aac tta cag tca tgg aat	528
Leu Ala Tyr Asn Lys Ile Asn Pro Ser Ser Asn Leu Gln Ser Trp Asn	
165 170 175	
tat gtt gtc ggg cag tgt cac tat att tct cac gct aat gga aag gta	576
Tyr Val Val Gly Gln Cys His Tyr Ile Ser His Ala Asn Gly Lys Val	
180 185 190	
tgt agt ggt gct gac agg caa cag tta gct gaa aat gta tgt aac tgg	624
Cys Ser Gly Ala Asp Arg Gln Gln Leu Ala Glu Asn Val Cys Asn Trp	
195 200 205	
tgt cag gtt aac ggt ggt gtt agc gct ttt gct agc agt agt tct gca	672
Cys Gln Val Asn Gly Gly Val Ser Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala	
210 215 220	





cat cca ggt gct tgc atg agt gat gta ggg ttc tgc tat gct tag 717  
 His Pro Gly Ala Cys Met Ser Asp Val Gly Phe Cys Tyr Ala  
 225 230 235

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> Zygosaccharomyces bailii

<400> 4

Met Lys Ala Ala Gln Ile Leu Thr Ala Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro  
 1 5 10 15

Ile Tyr Thr Ser Ala Arg Asn Ile Leu Asp Arg Glu Tyr Thr Ala Asn  
 20 25 30

Glu Leu Lys Thr Ala Phe Gly Asp Glu Glu Ile Phe Thr Asp Leu Thr  
 35 40 45

Tyr His Ile His Val Asn Val Ser Gly Glu Ile Asp Ser Tyr Tyr His  
 50 55 60

Asn Leu Val Asn Phe Val Asp Asn Ala Leu Ala Asn Lys Asp Ile Asn  
 65 70 75 80

Arg Tyr Ile Tyr Ala Ile Phe Thr Gln Gln Thr Asn Tyr Thr Glu Asp  
 85 90 95

Gly Leu Ile Glu Tyr Leu Asn His Tyr Asp Ser Glu Thr Cys Lys Asp  
 100 105 110

Ile Ile Thr Gln Tyr Asn Val Asn Val Asp Thr Ser Asn Cys Ile Ser  
 115 120 125

Asn Thr Thr Asp Gln Ala Arg Leu Gln Arg Arg Gly Gly Trp Val Asn  
 130 135 140

Pro His Cys Ser Gly Asp Asn Leu Ala Asp Thr Ser Asp Cys Cys Asn  
 145 150 155 160

Leu Ala Tyr Asn Lys Ile Asn Pro Ser Ser Asn Leu Gln Ser Trp Asn  
 165 170 175

Tyr Val Val Gly Gln Cys His Tyr Ile Ser His Ala Asn Gly Lys Val  
 180 185 190



Cys Ser Gly Ala Asp Arg Gln Gln Leu Ala Glu Asn Val Cys Asn Trp  
195 200 205

Cys Gln Val Asn Gly Gly Val Ser Ala Phe Ala Ser Ser Ser Ser Ala  
210 215 220

His Pro Gly Ala Cys Met Ser Asp Val Gly Phe Cys Tyr Ala  
225 230 235



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/02587 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/56**,  
9/24, C07K 16/40, C12N 1/16, C12Q 1/68, G01N 33/68,  
33/573, A61K 31/70, 38/45, 39/395, A01H 5/00

Filderstadt-Bonlanden (DE). **WEILER, Frank** [DE/DE];  
Bayernstr. 18, D-66111 Saarbrücken (DE). **SCHMITT,**  
**Manfred** [DE/DE]; In den Kastler Rödern 14, D-66386 St.  
Ingbert (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04972

(74) **Anwalt:** **ACKERMANN, Joachim**; Postfach 11 33 26,  
60048 Frankfurt am Main (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
31. Mai 2000 (31.05.2000)

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AU, BR, BY, CA, CN,  
CZ, HU, IL, IN, JP, KR, NO, NZ, PL, RO, SG, SK, TR,  
UA, US, YU, ZA.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:  
199 30 959.0 5. Juli 1999 (05.07.1999) DE

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US):** **AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES  
GMBH & CO KG** [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main  
(DE).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:** 7. Februar 2002

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** **REHFELDT, Klaus**  
[DE/DE]; Kohlberger Str. 16a, D-76139 Karlsruhe (DE).  
**THEISEN, Simone** [DE/DE]; Kreuzäckerstr. 29, D-70794

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** NOVEL ANTIFUNGAL AGENTS AND FUNGICIDES, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND  
THEIR USE

(54) **Bezeichnung:** NEUE ANTIMYCOTIKA UND FUNGIZIDE, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND IHRE VER-  
WENDUNG

(57) **Abstract:** The invention relates to the preparation of protein toxins from yeasts so-called killer yeasts using genetic technology  
in order to control human pathogenic and plant pathogenic yeasts and/or fungi, whereby these are selectively destroyed. The high  
specificity enables the protein toxins to be used as an antifungal agent and/or fungicide. In addition, protein toxins of this type can  
be used for protecting plants.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft die gentechnische Bereitstellung von Proteintoxinen aus Hefen - sogenannte Kil-  
lerhefen - zur Bekämpfung von human- und pflanzenpathogenen Hefen und/oder Pilzen, wobei diese selektiv abgetötet werden. Die  
hohe Spezifität gewährleistet den Einsatz der Proteintoxine als Antimycoticum und/oder Fungizid. Zudem können derartige Pro-  
teintoxine zum Pflanzenschutz verwendet werden.

WO 01/02587 A3



7  
(

(  
.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/04972

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7: C12N 15/56, C12N 9/24, C07K 16/40, C12N 1/16, C12Q 1/68, G01N 33/68, G01N 33/573, A61K 31/70, A61K 38/45, A61K 39/395, A01H 5/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7: C12N, C07K, C12Q, G01N, A61K, A01H Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RADLER F. ET AL.: "Investigation of a killer strain of <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ." JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, Vol. 139, Nr. 3, 1993, Pages 495-500, XP000952904 ISSN: 0022-1287 In the cited application	1-16, 19-23, 25
Y	The whole document	17, 18, 24, 26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2001 (12.01.01)		Date of mailing of the international search report 29 January 2001 (29.01.01)
Name and mailing address of the ISA European Patent Office		Authorized officer  Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/04972

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHMITT M. J. AND NEUHAUSEN F.: "Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeast <i>Hanseniaspora uvarum</i> and <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ." JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 68, Nr. 3, 1994, Pages 1765-1772, XP002157056 ISSN: 0022-538X in the cited application the whole document	1-16, 19-23, 25
Y	WALKER G. M. ET AL.: "INTERACTION BETWEEN KILLER YEASTS AND PATHOGENIC FUNGI" FEBS LETTERS, Vol. 127, Nr. 3, 01 April 1995 (01.04.95), Pages 213-222, XP000946950 ISSN: 0014-5793 the whole document	17, 18, 24
Y	EP 0 525 508 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 03 February 1993 (03.02.93) the whole document	26
A	MRSA V. ET AL.: "Purification and characterization of the <i>saccharomyces cerevisiae</i> BGL2 gene product, a cell wall endo-beta-1, 3-glucanase" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 175, Nr. 7, 01 April 1993 (01.04.93), Pages 2102-2106, XP002091793 ISSN: 0021-9193 In the cited application The whole document	1-24, 26
A	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NUMBER AF091241, 29 September 1998 (29.09.98) LAURINAVICHIUTE D. K. ET AL.: "Candida utilis beta-1, 3 glucan transferase Bgl2p (BGL2) gene." XP002150657 Abstract	1-24, 26
A	SHAH D. M. ET AL.: "Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Vol. 13, Nr. 9, September 1995 (09.95), Pages 362-368, XP004207202 ISSN: 0167-7799 Page 365, right column, Paragraph 3	1-24, 26



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/04972

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 670 706 A (CORNELISSEN BERNARDUS J C ET AL) 23 September 1997 (23.09.97) The whole document	26
A	US 5 783 183 A (LANGEVELD PIETER CORNELIS ET AL) 21 July 1998 (21.07.98) The whole document	1-24, 26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP 00/04972

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1-26 (in part)

Protein toxins extracted from *Williopsis californica* characterized by SEQ ID 2; nucleic acid that codes therefor and characterized by SEQ ID 1, method for producing this nucleic acid and this protein toxin; antibody directed against this protein toxin and method for the production thereof; medicament containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; diagnostic reagent containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; test for identifying functional interactors containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin; use of this nucleic acid for identifying functional interactors and for discovering variants; use of this protein toxin for controlling harmful yeasts and fungi in foodstuffs and feedstuffs; method for cultivating DSM12864, and; use of this nucleic acid for producing transgenic plants and plant cells.

2. Claims Nos. 1-26 (in part)

Protein toxins extracted from *Zygosaccharomyces bailii* characterized by SEQ ID 4; nucleic acid that codes therefor and characterized by SEQ ID 3, method for producing this nucleic acid and this protein toxin; antibody directed against this protein toxin and method for the production thereof; medicament containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; diagnostic reagent containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin and method for the production thereof; test for identifying functional interactors containing this nucleic acid, this antibody or this protein toxin; use of this nucleic acid for identifying functional interactors and for discovering variants; use of this protein toxin for controlling harmful yeasts and fungi in foodstuffs and feedstuffs; method for cultivating DSM12865, and; use of this nucleic acid for producing transgenic plants and plant cells.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/04972

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0525508 A	03-02-1993	AU 2037892 A	21-01-1993
		BR 9202728 A	23-03-1993
		CA 2074113 A	20-01-1993
		HU 65851 A	28-07-1994
		JP 6092993 A	05-04-1994
		MX 9204211 A	01-04-1993
		ZA 9205382 A	17-01-1994
US 5670706 A	23-09-1997	AU 654471 B	10-11-1994
		AU 7003491 A	01-08-1991
		CA 2035134 A	31-07-1991
		EP 0440304 A	07-08-1991
		JP 8280283 A	29-10-1996
		US 6087560 A	11-07-2000
		AT 197815 T	15-12-2000
		DE 69132479 D	04-01-2001
		IE 910298 A	31-07-1991
		PT 96599 A, B	15-10-1991
		US 6066491 A	23-05-2000
US 5783183 A	21-07-1998	WO 9420620 A	15-09-1994
		EP 0643771 A	22-03-1995
		FI 945114 A	31-10-1994
		JP 7506729 T	27-07-1995

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/04972

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/56 C12N9/24 C07K16/40 C12N1/16 C12Q1/68  
G01N33/68 G01N33/573 A61K31/70 A61K38/45 A61K39/395  
A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K C12Q G01N A61K A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RADLER, F. ET AL.: "Investigation of a killer strain of Zygosaccharomyces bailii." JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, Bd. 139, Nr. 3, 1993, Seiten 495-500, XP000952904 ISSN: 0022-1287	1-16, 19-23, 25
Y	in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/--	17, 18, 24, 26

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29.01.2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHMITT M. J. AND NEUHAUSEN F.: "Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeast Hanseniaspora uvarum and Zygosaccharomyces bailii." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 3, 1994, Seiten 1765-1772, XP002157056 ISSN: 0022-538X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-16, 19-23,25
Y	WALKER G. M. ET AL.: "INTERACTION BETWEEN KILLER YEASTS AND PATHOGENIC FUNGI" FEBS LETTERS, Bd. 127, Nr. 3, 1. April 1995 (1995-04-01), Seiten 213-222, XP000946950 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument ---	17,18,24
Y	EP 0 525 508 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 3. Februar 1993 (1993-02-03) das ganze Dokument ---	26
A	MRSA V. ET AL.: "Purification and characterization of the saccharomyces cerevisiae BGL2 gene product, a cell wall endo-beta-1,3-glucanase" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 175, Nr. 7, 1. April 1993 (1993-04-01), Seiten 2102-2106, XP002091793 ISSN: 0021-9193 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-24,26
A	DATABASE EMBL 'Online! ACCESSION NUMBER AF091241, 29. September 1998 (1998-09-29) LAURINAVICHUTE D. K. ET AL.: "Candida utilis beta-1,3 glucan transferase Bgl2p (BGL2) gene." XP002150657 Zusammenfassung ---	1-24,26
A	SHAH D. M. ET AL.: "Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 13, Nr. 9, September 1995 (1995-09), Seiten 362-368, XP004207202 ISSN: 0167-7799 Seite 365, rechte Spalte, Absatz 3 --- -/--	1-24,26

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 670 706 A (CORNELISSEN BERNARDUS J C ET AL) 23. September 1997 (1997-09-23) das ganze Dokument ----	26
A	US 5 783 183 A (LANGEVELD PIETER CORNELIS ET AL) 21. Juli 1998 (1998-07-21) das ganze Dokument -----	1-24, 26

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

## 1. Ansprüche: 1-26 (teilweise)

Proteintoxine aus *Williopsis californica* charakterisiert durch SEQ.ID. 2; dafür kodierende Nukleinsäure charakterisiert durch SEQ.ID.1; Verfahren zur Herstellung dieser Nukleinsäure und dieses Proteintoxins; Antikörper gegen dieses Proteintoxin und Verfahren zu ihrer Herstellung; Arzneimittel, das diese Nukleinsäure, diesen Antikörper oder dieses Proteintoxin enthält und Verfahren zu seiner Herstellung; Diagnostikum, das diese Nukleinsäure, diesen Antikörper oder dieses Proteintoxin enthält und Verfahren zu seiner Herstellung; Test zu Identifizierung von funktionellen Interaktoren, der diese Nukleinsäure, diesen Antikörper oder dieses Proteintoxin enthält; Verwendung dieser Nukleinsäure zur Identifizierung funktioneller Interaktoren und zum Auffinden von Varianten; Verwendung dieses Proteintoxins zur Bekämpfung von Schadhefen und Pilzen in Lebens- und Futtermittel; Verfahren zur Kultivierung von DSM12864; und Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung von transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen.

## 2. Ansprüche: 1-26 (teilweise)

Proteintoxine aus *Zygosaccharomyces bailii* charakterisiert durch SEQ.ID.4; dafür kodierende Nukleinsäure charakterisiert durch SEQ.ID.3; Verfahren zur Herstellung dieser Nukleinsäure und dieses Proteintoxins; Antikörper gegen dieses Proteintoxin und Verfahren zu ihrer Herstellung; Arzneimittel, das diese Nukleinsäure, diesen Antikörper oder dieses Proteintoxin enthält und Verfahren zu seiner Herstellung; Diagnostikum, das diese Nukleinsäure, diesen Antikörper oder dieses Proteintoxin enthält und Verfahren zu seiner Herstellung; Test zu Identifizierung von funktionellen Interaktoren, der diese Nukleinsäure, diesen Antikörper oder dieses Proteintoxin enthält; Verwendung dieser Nukleinsäure zur Identifizierung funktioneller Interaktoren und zum Auffinden von Varianten; Verwendung dieses Proteintoxins zur Bekämpfung von Schadhefen und Pilzen in Lebens- und Futtermittel; Verfahren zur Kultivierung von DSM12865; und Verwendung dieser Nukleinsäure zur Herstellung von transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen.

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/04972

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0525508 A	03-02-1993	AU 2037892 A	21-01-1993
		BR 9202728 A	23-03-1993
		CA 2074113 A	20-01-1993
		HU 65851 A	28-07-1994
		JP 6092993 A	05-04-1994
		MX 9204211 A	01-04-1993
		ZA 9205382 A	17-01-1994
US 5670706 A	23-09-1997	AU 654471 B	10-11-1994
		AU 7003491 A	01-08-1991
		CA 2035134 A	31-07-1991
		EP 0440304 A	07-08-1991
		JP 8280283 A	29-10-1996
		US 6087560 A	11-07-2000
		AT 197815 T	15-12-2000
		DE 69132479 D	04-01-2001
		IE 910298 A	31-07-1991
		PT 96599 A, B	15-10-1991
		US 6066491 A	23-05-2000
US 5783183 A	21-07-1998	WO 9420620 A	15-09-1994
		EP 0643771 A	22-03-1995
		FI 945114 A	31-10-1994
		JP 7506729 T	27-07-1995